

Aus der Klinik für Dermatologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**PCR und Fluoreszenz - DNA - Fragment -
Analyse zum Nachweis einer monoklonalen
B-Zell-Population zur Diagnostik der
kutanen B-Zell Lymphome (CBCL)**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Maren Marchwat
aus Eberswalde

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. PD Dr. A. Lukowsky

2. Prof. Dr. med. C. Neumann

3. Prof. Dr. H. Stein

Datum der Einreichung: 29.01.03

Datum der Promotion: 28.01.2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Überblick	6
1.1.1	Kutane B-Zell Lymphome: Definition und Epidemiologie	6
1.1.2	Klassifikation der CBCL	7
1.1.2.1	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	8
1.1.2.2	Kutanes Immunozytom / Marginalzonenlymphom	9
1.1.2.3	Großzelliges B-Zell Lymphom der unteren Extremität	10
1.1.2.4	Intravaskuläres B-Zell Lymphom	11
1.1.2.5	Plasmozytom	11
1.1.3	Diagnostik der kutanen B-Zell Lymphome	12
1.1.4	Die Genotypisierung	13
1.1.4.1	Genetische Organisation der humanen Immunglobuline	13
1.1.4.2	Nachweis von Translokationen	15
1.1.4.3	Southernblot Analyse	15
1.1.4.4	Klonalitätsanalyse mittels PCR	16
1.2	Problemstellung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Untersuchungsmaterial	19
2.1.1	Patienten	19
2.1.1.1	Gruppe 1: CBCL-Patienten	19
2.1.1.2	Gruppe 2: Kontrollen	19
2.1.1.3	Gruppe 3: Nicht primär kutane Lymphome	19
2.1.2	Geräte	20
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien, Pufferlösungen	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	DNA-Isolation	21
2.2.2	PCR-Grundlagen	21
2.2.2.1	Verschiedene Reaktionsgemische (RG)	21
2.2.2.2	PCR-Programme	21
2.2.3	FR3-PCR-Systeme	22
2.2.4	FR1-PCR-Systeme	24
2.2.5	Leader-PCR-Systeme	25
2.2.6	FR2-PCR-Systeme	25
2.2.7	Die IgL-PCR	26
2.2.8	Agarosegelelektrophorese (AGE)	26
2.2.9	Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE)	26
2.2.10	Kapillarelektrophorese (Genescan)	26
2.2.11	Primeranalyse im Oligo	27
2.2.11.1	Anforderungen an geeignete PCR-Primer	27
2.2.11.2	Unspezifische Doppelstrang-Bildung mit der Ziel-DNA	27
2.2.11.3	Effiziente Doppelstrangbildung mit der Ziel-DNA	27
2.2.11.4	Doppelstrang-Bildung zwischen Primern	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Definition von Klonalität	30
3.2	Ergebnisse der Suche geeigneter Primersysteme	31

3.2.1	Die FR3 - PCR in der Übersicht.....	31
3.2.1.1	Ergebnisse der Überprüfung der FR3- und JH-Primer im Oligo	32
3.2.1.2	PCR-Ergebnisse der getesteten FR3-Systeme	34
3.2.1.2.1	Ergebnisse der Konsensusprimer-PCR (s)	34
3.2.1.2.2	Ergebnisse der Konsensusprimer-PCR (sn)	37
3.2.2	Die FR1 - PCR im Überblick	38
3.2.2.1	Ergebnisse der Überprüfung der FR1-Primer im Oligo	38
3.2.2.2	PCR-Ergebnisse der getesteten FR1-Systeme	39
3.2.2.3	Entwicklung des neuen Primersystems	40
3.2.3	Die Leader - PCR	41
3.2.3.1	Ergebnisse der Überprüfung der Leader-Primer im Oligo	41
3.2.3.2	PCR-Ergebnisse des Leader-Systems	41
3.2.3.2.1	Testung mit DNA aus PBMC (polyklonal)	42
3.2.3.2.2	Testung mit Paraffinproben der CBCL	42
3.2.3.2.3	Testung mit Kryoproben der CBCL	42
3.2.4	Die FR2 - PCR im Überblick	42
3.2.4.1	PCR-Ergebnisse der FR2-Systeme	43
3.2.5	Die IgL - PCR	43
3.2.5.1	PCR-Ergebnisse der IgL-PCR	44
3.3	Nachweisgrenze	45
3.4	Analyse der CBCL-Fälle (Gruppe 1)	47
3.4.1	Nicht eindeutige Ergebnisse	50
3.4.2	Das Auftreten sogenannter „Pseudoklonalität“	52
3.4.3	Untersuchung falsch polyklonaler Proben mit der PCR 3.3. (Fodinger et al.)	55
3.5	Analyse der Kontrollen (Gruppe 2).....	56
3.6	Vergleich der molekularbiologischen Resultate mit Klinik und Histologie.....	58
3.7	Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen PCR-Systeme	59
3.8	Statistische Bewertung.....	62
3.9	Analyse der nicht primär kutanen Lymphome (Gruppe 3).....	63
4	Diskussion.....	64
4.1	Konventionelle Methoden zur CBCL-Diagnostik.....	64
4.2	Molekularbiologische Methoden zur CBCL-Diagnostik.....	66
4.2.1	Nachweis eines klonalen IgH-Rearrangements	66
4.2.1.1	Southernblot	67
4.2.1.2	PCR-Techniken	68
4.2.1.2.1	Auswahl des geeigneten Genortes	71
4.2.1.2.2	Analyse der verwendeten Primerkombinationen	72
4.2.1.3	Wahl der Elektrophoresemethode	74
4.3	Diskussion der Vergleichsuntersuchungen	75
4.3.1	Gruppeneinteilung	75
4.3.2	Ergebnisse des Vergleichs der PCR-Ansätze	75
4.3.3	Auswertung der Genescan-Profile	79
5	Zusammenfassung	81
6.	Literatur.....	83

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGE	Agarosegelelektrophorese
bp	Basenpaare
CBCL	kutanes B-Zell-Lymphom
CBCL der unt. Extr.	kutanes B-Zell Lymphom der unteren Extremität
CD	cluster of differentiation
CDR	complementary-determining-region
CLH	cutane lymphatische Hyperplasie
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
cons	konsensus
D	diversity
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
FAM	5-carboxyfluorescein
fam	familienspezifisch
FCCL	Follikel-Zentrumszell-Lymphom
FR	Framework
H	heavy
IC	Immunozytom
Ig	Immunglobulin
J	joining
k.A.	kein Amplifikat
Komb.-PCR	Kombination aus 4 PCR: FR1(n), FR2(n), FR3(sn) und FR3(s)
L	light
LEA	Leader
M	multiplexed
MALT – Lymphome	mucosa associated lymphatic tissue - lymphoma
mono / m	monoklonal
multiplex	alle fam-Primer in einem Ansatz
MZL	Marginalzonenlymphom
n	nested, geschachtelt
n.a.	nicht auswertbar
n.d.	nicht durchgeführt
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
n. mgl.	nicht möglich
ol	(pseudo)oligoklonal
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerasekettenreaktion
poly / p	polyklonal
REAL	Revised European-American Lymphoma Classification
RG	Reaktionsgemisch
s	single round, ungeschachtelt
SALT	skin associated lymphoid tissue
sn	seminested, halbgeschachtelt
Tab.	Tabelle
TGGE	Temperaturgradientengelelektrophorese
Tm	Schmelztemperatur
V	variable
X	pseudoklonal

Für alle Tabellen gilt:

XXX00: Abkürzung für die Arbeit, in welcher der Primer veröffentlicht wurde. Die drei Buchstaben entsprechen den drei Anfangsbuchstaben des zuerst genannten Autors, die Zahl bedeutet das Erscheinungsjahr.

1 Einleitung

1.1 Überblick

1.1.1 Kutane B-Zell Lymphome: Definition und Epidemiologie

Lymphoproliferative Erkrankungen der Haut werden in gutartige reaktive Veränderungen, sogenannte Pseudolymphome, und maligne kutane Lymphome eingeteilt (Kempf et al. 1999). Letztere unterteilen sich in primär und sekundär. Primär kutane Lymphome haben eine Inzidenz von 0,5-1 Neuerkrankungen/100 000/Jahr (Weinstock und Horn 1988, Burg et al. 1994). Zwanzig Prozent aller Lymphome befallen sekundär die Haut (Burg et al. 1984). Primär kutane Lymphome sind definiert als lymphoproliferative Hautinfiltrate, die ihren Ursprung von T-, B-, oder von undefinierten lymphozytären Zellen nehmen, zuerst in der Haut erscheinen und für mindestens sechs Monate nach Diagnosestellung auf die Haut beschränkt bleiben. Nach den MALT-Lymphomen stellen die primär kutanen Lymphome die zweithäufigste Gruppe der extranodalen Non-Hodgkin-Lymphome dar (Kempf et al. 1999).

Der Anteil der primär kutanen Lymphome, die ihren Ursprung von B-Lymphozyten nehmen, ist lange Zeit unterschätzt worden und wird heute mit etwa 25% angegeben (Kerl et al. 1994, Fritsch 1998).

Die Einwanderung von B-Zellen in die Haut ist durch sogenannte "homing factors" und Zytokine streng reguliert (Santucci et al. 1991). Hauptsächlich finden sich diese Zellen im mittleren und unteren Teil der Dermis und dort im perivaskulären Raum. Die Infiltrate maligner B-Zellen sind knotig, in der Dermis gelegen und wachsen drei-dimensional. Meistens liegt zwischen dem primär kutanen B-Zell-Lymphom (CBCL) und der darüberliegenden Epidermis eine freie Grenzzone (Fritsch 1998, Kempf et al. 1999). Diese typische Struktur kann bei großzelligen CBCL mit hohem Malignitätsgrad verloren gehen (Santucci et al. 1991, Kempf et al. 1999).

Als Ursache für die Entstehung kutaner Lymphome wird eine persistierende Antigenstimulation vermutet, z.B. durch Bakterien (*Borrelia burgdorferi*) (Slater 1994) oder Viren (EBV, HHV) (Cerroni und Kerl 1994b). Die Beteiligung der genannten Erreger wurde durch neuere Studien in Frage gestellt (Nagore et al. 2000, Munksgaard et al. 2000). Der auslösende Stimulus ist also weiterhin unklar (Slater 1994). Neben einer chronischen Stimulation könnte die Empfänglichkeit für Chromosomenaberrationen eine Rolle in der Genese kutaner Lymphome spielen (Rijlaarsdam et al. 1992, Neri et al. 1995).

Primär kutane Lymphome haben einen anderen klinischen Verlauf und eine andere Prognose als primär nodale Lymphome (Santucci et al. 1991). Sie unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer

Ursache, einiger histologischer Merkmale, sowie in molekularen Mechanismen (z.B. Deletionen, Translokationen, etc.), die an der Pathogenese beteiligt sind (Willemze et al. 1997, Kempf et al. 1999). Wegen des gutartigen klinischen Verlaufes glaubte man lange Zeit, dass es sich bei den CBCL um reaktive Prozesse handle (Clark et al. 1974). Erst Ende der 70iger Jahre des vergangenen Jahrhunderts, mit der Entwicklung von modernen histologischen und molekularbiologischen Techniken, setzte sich die Erkenntnis durch, dass es sich bei diesen Hautveränderungen wirklich um maligne Erkrankungen handelt (Willemze et al. 1983, Gianotti und Santucci 1993).

1.1.2 Klassifikation der CBCL

Den ersten Klassifikationsversuch unternahmen *Schmöckel et al.* (1979). Sie zogen Analogien zu den systemischen Lymphomen und übertrugen die damals verwendete Kiel-Klassifikation von 1974 auf die kutanen Lymphome. In den USA war es vor allem die „Working Formulation“, die ab 1982 Einzug hielt, während in Europa weiterhin die Kiel-Klassifikation dominierte (Working Formulation 1982). Im Jahre 1994 arbeitete eine internationale Arbeitsgruppe („International Lymphoma Study Group“) daran, eine klinisch anwendbare Synthese aus der „Working Formulation“ und der „Kiel Klassifikation“ mit dem Namen „Revised European-American Lymphoma Classification“ (REAL) zu etablieren, um eine internationale Basis für den Erfahrungsaustausch der Hämatopathologen und für die Vergleichbarkeit klinischer Studien zu schaffen (Chan et al. 1995). Neue Untersuchungsmethoden und exakte Fallstudien der nächsten Jahre haben zu der Annahme geführt, dass sich B-Zell Lymphome in der Haut nicht nur primär bilden können, sondern dass sich diese Lymphome in vielerlei Hinsicht auch von den nodalen Lymphomen des gleichen histologischen Subtyps unterscheiden (Gianotti und Santucci 1993, Russell-Jones 1998). Deshalb entschied sich die „Cutaneous Lymphoma Study Group“ der „European Organization for Research and Treatment of Cancer“ (EORTC) 1994 für eine eigene Klassifikation der primär kutanen B-Zell Lymphome, trotz der Vielzahl der bereits vorhandenen Modelle (Russell-Jones 1998).

Von allen Klassifikationen berücksichtigt die EORTC am meisten den klinischen Verlauf und das Therapieverhalten der CBCL. Auf rein histologische Subklassifizierungen wurde bewusst verzichtet, da sie für den Verlauf, Therapie und Prognose irrelevant sind (Duncan 1999, Kempf et al. 1999). Der Kliniker soll mit Hilfe des Klassifikationsschemas in der Lage sein, sich eindeutig für das weitere Procedere und die Therapie zu entscheiden (Willemze et al. 1997). In der folgenden Tabelle 1 sind die EORTC-Klassifikation und die WHO-Klassifikation (ein Update der REAL-Klassifikation) gegenübergestellt.

Tab. 1: Vergleich der Klassifikationen aus (Fink-Puches et al. 2002)

EORTC-Klassifikation	WHO-Klassifikation
primär kutanes Immunozytom/Marginalzonenlymphom	extranodales Marginalzonenlymphom des MALT-Typs
Primär kutanes Follikel-Zentrumszell-Lymphom	Follikuläres Lymphom
Primär kutanes B-Zell-Lymphom der unteren Extremität	Diffuses großzelliges Lymphom
Primär kutanes Plasmozytom	Extramedulläres Plasmozytom

Die EORTC teilt die CBCL in drei Gruppen ein (Willemze et al. 1997, Sander et al. 1999, Russell-Jones 1998):

„Indolent“ - CBCL (mit guter Prognose)

- Follikel-Zentrumszell-Lymphom (FCCL)
- Immunozytom/Marginalzonenlymphom (IC)/(MZL)

„Intermediate“ - CBCL (mit ungünstigerer Prognose)

- Großzelliges B-Zell-Lymphom der unteren Extremität (CBCL of the lower leg)

„Provisional“ - CBCL (vorläufige Entitäten von CBCL)

- Intravaskuläres B-Zell Lymphom
- Plasmozytom

1.1.2.1 Follikel-Zentrumszell-Lymphom

Die FCCL, auch als Keimzentrumszelllymphome bezeichnet, sind der häufigste Typ der CBCL (Willemze et al. 1997). Sie können noch in folgende Untergruppen unterteilt werden: Follikuläre, follikulär-diffuse und diffuse FCCL (Berti et al. 1990). Es handelt sich um einen niedrig malignen Tumor, der von Keimzentrums-Zellen ausgeht und seine typische Lokalisation an Kopf und Oberkörper hat (Kempf et al. 1999, Bergmann et al. 2001). Man findet kleine Knoten mit Erythem, meist einzeln oder in Gruppen angeordnet und polsterartige Plaques (Willemze et al. 1997, Duncan 1999).

Histologisch zeigen sich knotige oder diffuse Infiltrate follikulären Ursprungs, die in Dermis oder Subkutis gelegen sind und variierende Anteile an Zentrozyten, atypischen Zentroblasten und reaktiven T-Lymphozyten enthalten (Russell-Jones 1998).

Laut EORTC-Klassifikation gehören zu den FCCL sowohl Lymphome mit kleinen lymphatischen Zellen in den Läsionen als auch Lymphome, die hauptsächlich Läsionen mit großen lymphatischen Zellen zeigen, es sei denn, die Läsionen befinden sich ausschließlich an der unteren Extremität (siehe 1.1.2.3.). Nach der REAL-Klassifikation dagegen werden Lymphome mit großen Zellen in den Läsionen als "Diffuse Large Cell B-Cell Lymphoma"

bezeichnet (Sander et al. 1997).

Diese Lymphomart unterscheidet sich neben seinem histologischen Bild auch in seinem größeren Wachstumspotential (gemessen an der Anzahl der MIB-1 positiven Zellen), seiner vermehrten Expression des Retinoblastom Proteins und scheint mit einer schlechteren Prognose verbunden zu sein (Grönbäk et al. 2000).

Immunophänotypisch zeigen die Tumorzellen B-Zell assoziierte Antigene wie CD19, CD20, CD79A. Sie sind CD5 (charakteristisch für zentrozytische NHL und chronisch lymphatische Leukämien [CLL]) und CD43 negativ (Neri et al. 1995, Duncan 1999). Im Gegensatz zu den nodulären FCCL finden sich CD10 (Marker für frühe B-Zell Aktivierung (Neri et al. 1995)) und bcl-2 Positivität eher selten (Willemze et al. 1997). Eine Leichtketten-Restriktion (es werden nur κ oder λ Ketten exprimiert) ist häufig vorhanden (Slater 1994). In etwa 20% der Fälle ist eine starke Positivität für MT2 (CD45RO) in den neoplastischen Keimzentren nachweisbar. Da man MT2-Positivität nie in reaktiven Keimzentren findet, ist dieser Marker eine Möglichkeit zwischen kutanen FCCL und Pseudolymphomen zu unterscheiden (Cerroni et al. 1997).

T(14;18)-Translokationen sind in nodulären FCCL zu 70-95% vorhanden (Sander et al. 1997). Ob diese Translokation auch bei den CBCL eine Rolle spielt, bleibt widersprüchlich (Cerroni et al. 1994a, Russell-Jones 1998, Grönbäk et al. 2000, Bergmann et al. 2001). Überwiegend wird eine t(14;18) Translokation bei primären CBCL aber eher ausgeschlossen (Willemze et al. 1997, Duncan 1999). In den meisten Fällen zeigt das FCCL keine Tendenz zum generalisierten Hautbefall (Cerroni et al. 1997). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt über 90% (Kempf et al. 1999, Kerl et al. 2001).

Die Therapie erfolgt möglichst wenig aggressiv. Sie beschränkt sich meist auf die Exzision einzelner Herde, Bestrahlung oder Immuntherapie (Duncan 1999).

1.1.2.2 Kutanes Immunozytom / Marginalzonenlymphom

In der EORTC-Klassifikation wird das Immunozytom (IC) und das Marginalzonenlymphom (MZL) in einer Gruppe zusammengefasst, während die REAL-Klassifikation zwischen beiden trennt. Das MZL ist sowohl mit dem IC als auch mit dem MALT-Lymphom eng verwandt (Neri et al. 1995, Cerroni et al. 1997, Duncan 1999). Im Jahre 1993 prägten *Gianotti* und *Santucci* den Begriff SALT-Lymphom („skin associated lymphoid tissue lymphomas“) für diese Art von Tumoren (Gianotti und Santucci 1993, Kempf et al. 1999, Duncan 1999). Die Unterscheidung zwischen den einzelnen Typen ist schwierig, meist finden sich fließende Übergänge (Cerroni et al. 1997, Duncan 1999). *Slater* warf 1994 die Diskussion auf, dass sogar die FCCL, in Analogie zu den MALT Lymphomen, eigentlich zu den MZL gehören. Eine eindeutige Zuordnung wird nur durch weitere intensive Forschung möglich sein (Willemze et al. 1997).

Das MZL zeigt klinisch einzelne oder zusammengelagerte erythematöse Papeln, Knoten oder Plaques, die an den oberen Extremitäten oder am Oberkörper lokalisiert sind (Duncan 1999). Prädilektionsstellen des IC sind die unteren Extremitäten (Rijlaarsdam et al. 1993), sonst ähnelt das klinische Bild dem MZL. Bei beiden Typen sind überwiegend Frauen mittleren Alters betroffen (Bailey et al. 1996, Baldassano et al. 1999). Wenn es zur Ausbreitung des Tumors kommt, dann häufig nur extranodal (Duncan 1999). Immunozytome können aus einer Acrodermatitis atrophicans hervorgehen (Kerl et al. 1994).

Histologisch und immunophänotypisch ähneln sich MZL und IZ stark. Es finden sich knotige oder diffuse Infiltrate von kleinen Lymphozyten, plasmazytoide Zellen und Plasmazellen in der Dermis und manchmal auch in der Subkutis. Das Infiltrat ist eher monomorph, reaktive Keimzentren kommen jedoch vor (Cerroni et al. 1997, Kempf et al. 1999). PAS-positive intranukleäre Einschlüsse (Dutcher-bodies) findet man gewöhnlich in den lymphoplasmazytoiden Zellen (Kempf et al. 1999). Dies ist ein hilfreicher diagnostischer Hinweis. Häufig ist ein reaktives T-Zell Infiltrat zu finden (Duncan 1999).

Die neoplastischen Zellen exprimieren im Allgemeinen CD79a und CD20 (Ausnahme Plasmazellen: CD20 negativ). Sie sind negativ für CD5 und CD10 (Willemze et al. 1997, Rijlaarsdam et al. 1993). Die Expression von CD32 deutet auf den Marginalzonenursprung der klonalen Zellen hin (Slater 1994, Neri et al. 1995). In 50% der Fälle findet sich eine aberrante Positivität für CD43 (Cerroni et al. 1997). Häufig zeigen die Zellen eine intrazytoplasmatische Reaktivität für den monozytischen Antikörper KiM1p (Kerl et al. 2001).

Es sind keine spezifischen Translokationen bekannt (Kerl und Cerroni 1997).

Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 98%, obwohl lokale Rezidive häufig sind (Fink-Puches et al. 2002). Therapeutisch versucht man zunächst Bestrahlung und/oder lokale Injektion von Steroiden. In fortgeschrittenen Stadien erfolgt Chemotherapie (Duncan 1999).

1.1.2.3 Großzelliges B-Zell Lymphom der unteren Extremität

Das „CBCL of the lower leg“ wird nach der WHO-Klassifikation als diffuses großzelliges B-Zell Lymphom bezeichnet und ist ein primär kutanes B-Zell Lymphom mit typischer Lokalisation an der unteren Extremität (Duncan 1999).

An den Unterschenkeln (perimalleolär) treten livid verfärbte Knoten mit schneller Grössenzunahme auf. Eine Ulzeration ist nicht ungewöhnlich (Duncan 1999). Lymphknotenbeteiligung und innere Aussaat sind möglich. Die Patienten sind in 80% der Fälle über 70 Jahre alt, Frauen sind häufiger betroffen als Männer (Cerroni et al. 1997).

Histologisch findet sich ein dichtes dermales lymphozytäres Infiltrat, das sich auf das subkutane Gewebe ausweitet. Zytomorphologisch handelt es sich bei den Tumorzellen hauptsächlich um

Zentroblasten oder Immunoblasten (Duncan 1999). Mitosen sind häufig zu finden. Es wird vermutet, dass die meisten Fälle von CBCL der unt. Extr. ihren Ursprung von Keimzentrumszellen nehmen (Cerroni et al. 1997).

Auf der Oberfläche der Zellen findet sich immunhistologisch eine Leichtkettenrestriktion. Sie sind positiv für CD19 und CD20 und exprimieren häufig das bcl-2 Protein (Geelen et al. 1998, Kempf et al. 1999). Eine t(14;18) Translokation ist gewöhnlich nicht nachweisbar (Willemze et al. 1997, Geelen et al. 1998, Duncan 1999).

Die 5 Jahres-Überlebensrate ist mit etwa 60% nicht so günstig wie bei den anderen primären CBCL (Willemze et al. 1997, Fink-Puches et al. 2002).

Aufgrund der höheren Malignität sind Bestrahlung und Polychemotherapie indiziert (Duncan 1999).

1.1.2.4 Intravaskuläres B-Zell Lymphom

Bei dem Intravaskulären B-Zell Lymphom handelt sich um ein seltenes malignes Lymphom mit intravasaler Ansammlung von großen neoplastischen B-Zellen (Willemze et al. 1997). In der REAL-Klassifikation wird es dem diffusen großzelligen B-Zell Lymphom zugeordnet (Duncan 1999).

Der Rumpf und die Extremitäten sind klinisch hauptsächlich betroffen. Man findet livide verfärbte Plaques unterschiedlicher Größe.

Eine Beteiligung des zentralen Nervensystems wird nicht selten beobachtet. Die Patienten sind meist über 50 Jahre alt, bei Frauen tritt die Erkrankung häufiger auf. Histologisch finden sich große atypische B-Zellen, welche Arteriolen, Venolen und Kapillaren der Dermis und Subcutis verschließen (Willemze et al. 1997).

Immunophänotypisch charakteristisch ist die Expression von CD19, CD20, CD22, CD79a und monotypischen Immunglobulinen auf der Oberfläche der malignen Zellen (Duncan 1999).

Die intravaskulären B-Zell Lymphome haben eine schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate unter 50%. Dieses Lymphom hat eine Tendenz zur systemischen Ausbreitung (Kempf et al. 1999). Deshalb ist eine Kombinationschemotherapie therapeutisch indiziert (Duncan 1999).

1.1.2.5 Plasmozytom

Das Plasmozytom der Haut ist ein sehr seltenes extramedulläres Plasmozytom mit einer neoplastischen Proliferation von Plasmazellen, die ohne Knochenmarksbeteiligung auftritt. Ein Progress zum Myelom ist aber möglich (Duncan 1999).

Klinisch zeigen sich einzelne oder multiple, livide oder rote, kutane bzw. subkutane Knoten, hauptsächlich im Bereich von Kopf und Rumpf. Betroffen sind Männer mittleren Alters. Bei der

histologischen Untersuchung findet man noduläre oder diffuse Infiltrate von Plasmazellen in Dermis und subkutanem Fettgewebe. Mitosen und Zellatypien sind in unterschiedlichem Ausmass zu erkennen.

Immunophänotypisch charakteristisch ist zelluläres monotypisches Immunglobulin (Leichtkettenrestriktion). Die B-Zell bezogenen Marker (CD19, CD20, CD22) sind negativ (Duncan 1999).

Die Prognose wird kontrovers diskutiert. Therapeutisch nimmt man eine Exzision der Knoten und Bestrahlung vor (Willemze et al. 1997).

1.1.3 Diagnostik der kutanen B-Zell Lymphome

Bei der Diagnosestellung eines CBCLs ist es wichtig eine extrakutane Beteiligung auszuschliessen. Nur dies lässt eine Abschätzung der Prognose bei primär kutanen B-Zell Lymphomen zu und rechtfertigt das wenig aggressive therapeutische Vorgehen (Kerl et al. 1994). Die EORTC empfiehlt folgende Richtlinien für die Diagnostik der CBCL: routinemäßige körperliche Untersuchung (insbesondere mit Inspektion und Palpation der Lymphknotenstationen, Milz, Leber), Dokumentation der Hautläsionen, Blut- und Urinuntersuchungen, CT-Thorax und Abdomen, evtl. Sonographie, Hautbiopsien, Subtypisierung der Lymphozyten im peripheren Blut, Biopsie vergrößerter Lymphknoten und des Knochenmarkes. Das Staging erfolgt nach dem TNM System (Kerl et al. 1994).

Des weiteren ist es wichtig ein CBCL von benignen Hautveränderungen abzugrenzen.

Wie erwähnt, finden sich kutane B-Zell Infiltrate sowohl bei reaktiven Hautveränderungen (bezeichnet als Pseudolymphom, Lymphozytom, kutane lymphatische Hyperplasie (CLH), Lymphadenosis cutis benigna, gutartige benigne lymphoide Hyperplasie der Haut) als auch bei CBCL (Bailey et al. 1996). Weil sowohl benigne Hautveränderungen als auch CBCL viele klinische und histopathologische Aspekte gemein haben, ist die Unterscheidung zwischen ihnen sehr schwierig (Kempf et al. 1999).

Früher wurde die Diagnose eines CBCL nur auf der Grundlage der Klinik und der Histopathologie gestellt, bis die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern, eine Immunophänotypisierung von Zellen ermöglichte. Mit dieser Methode war es möglich festzustellen, um welche Zelllinie es sich handelt und wie der Grad der Differenzierung bzw. die Aktivierung der Zellen ist. Anhand einer monotypischen Immunglobulinexpression konnten monoklonale B-Zell Infiltrate erkannt werden (Weinberg et al. 1993). Doch auch die Immunophänotypisierung hat ihre diagnostischen Grenzen: Zum einen werden einige Aktivierungsmarker sowohl von benignen als auch von malignen Zellinfiltraten exprimiert, zum anderen ist es, wenn einige Differenzierungsmarker nicht exprimiert werden, schwierig, die

Zelllinie und die Dignität des Infiltrats zu bestimmen (Weinberg et al. 1993).

Um die Probleme der Immunophänotypisierung zu umgehen, wurde die Molekulare Diagnostik entwickelt, welche auf der molekularbiologischen Analyse der Zellen beruht. Doch gerade bei der Untersuchung von extranodalen Lymphomen, ist der Nachweis von Klonalität, mit Hilfe von PCR oder Southernblot, aufgrund der geringen Sensitivität, häufig keine Hilfe für den Kliniker. Während bei den nodalen Lymphomen eine Sensitivität von 80-90% erreicht wird (Deane und Norton 1991, Ramasamy et al. 1992, Lehmann et al. 1995), kann bei der Untersuchung der CBCL nur eine Sensitivität von durchschnittlich 30-70% erreicht werden (Ritter et al. 1997, Cerroni et al. 1997, Signoretti et al. 1999, Alaiabac et al. 2001).

Schwierigkeiten bereitet ausserdem der Nachweis von klonalen B-Zell Infiltraten in CLH bezüglich der Signifikanz für die Prognose der Patienten. In der Studie von Wood *et al* (1989) entwickelte einer von fünf Patienten mit CLH und klonalem B-Zell Infiltrat ein systemisches Lymphom. Die Vermutung, dass Patienten mit einem klonalem Infiltrat bei CLH ein höheres Risiko für die Entwicklung eines Lymphoms haben, konnte in folgenden Studien aber nicht bestätigt werden (Rijlaarsdam et al. 1992, Landa et al. 1993).

1.1.4 Die Genotypisierung

Die Genotypisierung ist eine molekularbiologische Methode zum Nachweis genetischer Merkmale, um eine Zelle zu charakterisieren, wie z.B. das Auftreten von Rearrangements einzelner Gensegmente des IgH-Gens während der Maturation der B-Zellen. Die Basenfolge des rearrangierten IgH-Gens reifer B-Zellen ist nahezu zellspezifisch. Nur bei der Proliferation eines Klons treten mehrere Zellen mit identischen Rearrangements auf.

Eine weitere Möglichkeit ist der Nachweis von Translokationen.

1.1.4.1 Genetische Organisation der humanen Immunglobuline

Der Antigenrezeptor (B-Zell-Rezeptor, Immunglobulin), den die reife B-Zelle auf ihrer Oberfläche trägt, besteht aus einer schweren (H-) und einer leichten (L-) Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, wobei sich beide Ketten in eine NH₂-terminale variable (V)-Region für die Antigen (Ag) -Bindung und eine COOH-terminale konstante (C)-Region für die Effektorfunktionen unterteilen lassen. Zwei identische solcher H-L Paare sind durch Disulfidbrücken miteinander gekoppelt (Burmester et al. 1998). Die Gene für die H- und L-Ketten werden erst im Verlauf der B-Zell Ontogenese aus einzelnen, diskontinuierlich angeordneten Ig-Gensegmenten zusammengefügt (Lukowsky et al. 1990). Die Leichtketten existieren in zwei verschiedenen Formen: κ und λ . Der variable Bereich der Ig-Schwerketten wird durch drei, in der Keimbahn separate Genabschnitte auf Chromosom 14, kodiert. Diese sind die VH-, DH- und JH- Gene. Die L-Ketten werden dagegen durch VL und JL-Segmente auf den

Chromosomen 2 und 22 kodiert.

Das Rearrangement der H-Ketten erfolgt vor den L-Ketten beim Übergang der Stammzelle in die prä-B-Zelle. Das Prinzip des Genrearrangements soll anhand des IgH-Gens erläutert werden:

Eines der 27 D-Segmente kombiniert zunächst mit einem von neun JH-Genen, es ergibt sich ein DJH-Abschnitt (Ravetch et al. 1981). Dieser rearrangiert dann mit einem von 123 VH-Segmenten und formiert den VDJH-Komplex, der in dieser Form die variable Region der schweren Kette kodiert (Matsuda et al. 1998). Die für die Antigenbindung entscheidenden Bereiche der V-Domäne wurden von *Kabat und Wu* (1971) durch statistische Auswertung von Mutationsanalysen der damals bekannten Sequenzen postuliert und mündeten in der noch heute angewandten Einteilung der VDJ-Sequenzen in vier framework-region (FR) und drei complementary-determining-region (CDR). Am 5'-Ende eines jeden V-Segmentes ist noch eine Leader-Region (LEA) und ein Intron von etwa 100 bp angelagert (siehe Abb.1).

Neben den Kombinationsmöglichkeiten, trägt noch die funktionale Diversität zur Mannigfaltigkeit der IgH-Moleküle bei. Diese entsteht durch „unsauberes“ Aneinanderfügen der Gensegmente, Abspaltung von einzelnen Nukleotiden durch Exonukleasen und durch Einfügen der sogenannten N-Sequenzen in die Verbindungsstellen der Segmente durch die „Terminale Desoxynukleotid-Transferase“ (TdT) (Desiderio et al. 1984). Die Diversitätsentstehung wird durch den Prozess der somatischen Hypermutation vervollständigt. Dieser findet Antigen- und T-Zell-abhängig in den Keimzentren der sekundär lymphatischen Organe statt. Dort entstehen aus den B-Zellen Zentroblasten. Diese weisen eine extrem hohe Mutationsrate auf. Durch diese Punktmutationen kann sich die Affinität der Immunglobuline für das Antigen steigern (Burmester et al. 1998).

Die leichten Ketten werden nach einem ähnlichen Muster generiert. Allerdings fehlen hier die D-Elemente. Der V κ -Genort umfasst etwa 76V κ - und 5J κ - Gensegmente (Shiokawa et al. 1998). Die Anzahl der Segmente des V λ -Gens beträgt ca. 70, die des J λ -Gens sieben (Küppers et al. 1995).

Während der B-Zell Entwicklung wird zunächst der IgH-Genlokus auf einem Allel des Chromosoms 14 rekombiniert. Sollte das IgH-Rearrangement unproduktiv sein, so kann in der Zelle eine zweite Umlagerung unter Verwendung des zweiten Allels erfolgen. Danach erfolgt die Rekombination der Leichtketten. Hier wird zuerst der κ -Lokus rekombiniert. Sollte das Rearrangement auf dem einem Allel unproduktiv sei, kommt es wie beim IgH-Rearrangement zur Verwendung des zweiten Allels. Erst wenn beide Allele des κ -Lokus unproduktiv sind, wird der Ig λ Lokus rearrangiert (Lukowsky et al. 1990).

Ist die Bildung eines funktionstüchtigen Rearrangements bei der H- bzw. L-Kette nicht erfolgt, führt dies zum programmierten Zelltod (Apoptose).

1.1.4.2 Nachweis von Translokationen

Im Gegensatz zu verschiedenen Formen der Non-Hodgkin-Lymphome, wo man verschiedene Translokationen von Onkogenen einer bestimmten Form von NHL zuordnen kann, weiss man wenig über die Pathogenese der CBCL. Am besten untersucht ist die interchromosomale t14;18 Translokation, die in etwa 70% der nodulären FCCL auftritt und das bcl-2 Onkogen mit dem IgH-Gen fusioniert (Yunis et al. 1982).

Das bcl-2 Protein, ein 26 kDa Protein, schützt die Zellen vor dem programmierten Zelltod, der Apoptose (Liu et al. 1992). Durch die Translokation kommt es zur erhöhten Expression des bcl-2 Proteins, welches Ausgangspunkt für ein unkontrolliertes Zellwachstum ist.

Da auch ein Teil der CBCL von den Keimzentrumszellen ausgehen, wurden auch diese Lymphome auf ein bcl-2 Rearrangement mittels PCR oder Southernblot untersucht. Eine t14;18 Translokation konnte, bis auf wenige Ausnahmen, weder bei den CBCL der unt. Extr. noch bei den anderen Formen von CBCL nachgewiesen werden (Delia et al. 1989, Wood et al. 1989, Cerroni et al. 1994a, Geelen et al. 1998). Das Vorhandensein dieser Translokation gilt somit eher als Hinweis auf eine sekundären Hautmanifestation bei Vorliegen eines systemischen Lymphoms (Kerl et al. 1994, Slater 1994, Kerl et al. 2001).

Neri et al. (1995) untersuchten CBCL auf weitere genetische Läsionen, die für noduläre NHL typisch sind. Southernblot Analyse wurde durchgeführt, um ein Rearrangement folgender Onkogene zu detektieren: c-myc, bcl-1, bcl-2, bcl-3, bcl-6 und NFKB2/lyt 10. In 13% der untersuchten CBCL konnte ein Rearrangement der Onkogene nachgewiesen werden. Die geringe Anzahl an genetischen Läsionen zeigt, dass überwiegend andere molekulare Wege der Pathogenese der CBCL unterliegen, und dass deshalb der Versuch einer Diagnosestellung mit Hilfe des Nachweises der untersuchten Translokationen nicht sinnvoll ist.

1.1.4.3 Southernblot Analyse

Molekularbiologische Methoden werden seit dem Anfang der achtziger Jahre zunehmend eingesetzt, um die Klonalität von T- oder B-Lymphozyten und damit ihre Dignität einzuschätzen (Arnold et al. 1983). Die erste angewandte Methode war das Southernblotting. Die DNA wird dabei aus den Zellen präpariert und mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Dann werden die entstandenen DNA-Fragmente in einem Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen (Blotting). Die definierten Genabschnitte werden durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Gensonden sichtbar. IgH-Gene in der Keimbahnkonfiguration zeigen ein bei allen Individuen identisches Schnittmuster und sind somit als definierte Banden im Blot erkennbar. Polyklonal rearrangierte Gene verteilen sich über den gesamten Trennbereich der Elektrophorese, da sie eine hohe Heterogenität der Fragmente aufweisen. Auf der Elektrophoresespur sieht man einen

sogenannten „Schmier“. Aus DNA klonal expandierter, genotypisch identischer Zellen entsteht eine große Anzahl identischer Fragmente, die sich im Southernblot als eine definierte Bande außerhalb der Keimbahnbanden abbilden (Weinberg et al. 1993).

1.1.4.4 Klonalitätsanalyse mittels PCR

Zu Beginn der neunziger Jahre hat sich die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgesetzt. Diese Technik basiert auf der gezielten Vervielfältigung spezieller DNA-Abschnitte. Vorteile sind die kurze Zeitdauer (ca. 1 Tag), die Möglichkeit ohne Radioaktivität zu arbeiten, sowie die Anwendbarkeit dieser Technik an routinemäßig fixiertem und Paraffin-eingebettetem Biopsiematerial (Stery und Staib 1995). Mit Hilfe von Primern für die schwere bzw. die leichte Kette des Immunoglobulins werden Segmente amplifiziert, die für die Antigenbindung verantwortliche, hochvariable CDR-Region beinhalten. Wenn nun ein Klon in dem zu untersuchenden Material vorliegt, dann ist ein und dasselbe IgH-Rearrangement in den Klonzellen enthalten, so dass dieses Amplifikationsprodukt derartig häufig auftritt, dass es sich in einer Elektrophorese als eine diskrete Bande oder als Peak darstellt.

Es zeichnen sich bei der Klonalitätsanalyse mittels PCR zwei unterschiedliche Strategien ab. Für die allgemeine Routine wird versucht, mit einem oder mehreren Primerpaaren alle theoretisch möglichen Rearrangements der V-, D- und J-Gene zu amplifizieren und nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte deren Dignität zu bestimmen.

Für Einzelfälle werden die Sequenzen der IgH-Gene diagnostizierter Patienten ermittelt und daraus patientenspezifische Primer konstruiert, die zur Verlaufsüberwachung eingesetzt werden können.

Da das VDJ-Rearrangement (IgH) in seiner Sequenz sehr variabel ist, kann die Primerbindung nur in sogenannten konservierten Bereichen, den sogenannten Frameworkregionen erfolgen (Abb.1).

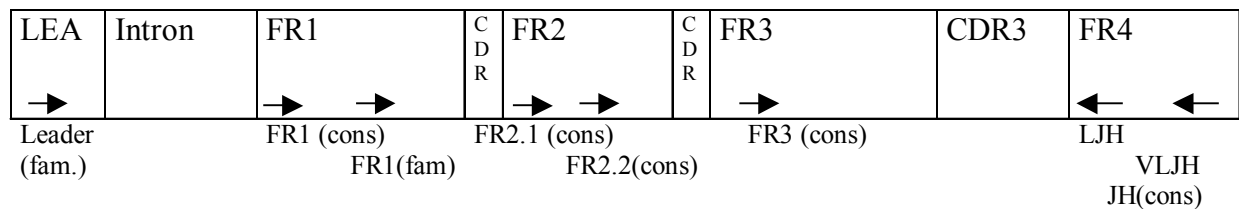
Abb. 1: Aufbau des VDJ-Rearrangements

Leader (LEA) 46bp	Intron 100bp	FR1 90bp	C D R 1	FR2 40bp	C D R 2	FR3 90bp	CDR3 (N-Region) 20-30bp	FR4(JH) 40bp
-------------------------	-----------------	-------------	------------------	-------------	------------------	-------------	-------------------------------	-----------------

Das IgH-Rearrangement beinhaltet vier FR-Regionen. FR-4 (JH) wird für die Anlagerung der rückwärts-Primer (3'), FR1-3 zur Anlagerung der vorwärts-Primer (5') verwendet, immer mit dem Ziel die hochvariable CDR-3 Region zu amplifizieren. Zusätzlich sind für die Leaderregion familienspezifische (fam) 5'-Primer entwickelt worden. Die Intronsequenzen sind, bis auf die der VH3 Familie, sehr unterschiedlich und somit nicht für die Primerbindung geeignet. Alle PCR-Systeme können sowohl ungeschachtelt (s), halbggeschachtelt (sn) oder geschachtelt (n)

durchgeführt werden. Die Primerbindungsmöglichkeiten sind in Abbildung 1.2 noch einmal dargestellt.

Abb. 2: Bindungsorte der verschiedenen Primer



Die einzelnen V-Gensegmente der Keimbahn sind in 7 verschiedene VH-Genfamilien eingeteilt worden (Tab. 2).

Tab. 2: Die 7 VH-Familien aus (Matsuda et al. 1998)

Segment	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	VH7	D	J
Funktional	9	3	19	7	1	1	-	25	6
ORF	-	-	3	-	-	-	1	2	-
Pseudo	5	1	43	25	1	-	4	1	3

Zu einer VH-Genfamilie zählen die Segmente, welche eine Homologie der Nukleotidsequenz von 80% und mehr aufweisen. Pseudogene (Pseudo) sind Segmente, die aufgrund von Veränderungen in ihrem Aufbau zu einem unproduktiven Rearrangement führen. Die Funktionstüchtigkeit der mit ORF (Open Reading Frame) bezeichneten Segmente ist fraglich (Matsuda et al. 1998).

Für den FR1-, FR2- und den FR3-Bereich besteht die Möglichkeit der Verwendung eines sogenannten „konsensus“ (cons)-Primers, da eine ausreichende Homologie der Sequenz familienübergreifend vorhanden ist. Für die Leader-Region sind zunächst nur familienspezifische (fam) Primer entwickelt worden.

Die IgL-Genorte sind wegen ihrer hohen Variabilität nur selten für die PCR-Diagnostik verwendet worden. Die V κ -Gensegmente sind in 6- die V λ -Gensegmente sogar in 10 Familien unterteilt, basierend auf den FR1-Sequenzen dieser Segmente. Die meisten Gensegmente gehören der ersten und zweiten Familie an. Im Gegensatz zu dem IgH-Familien sind die Familien der IgL-Gene sehr polymorph.

1.2 Problemstellung

Grundproblem der Diagnostik maligner B-Zell-Lymphome der Haut ist, dass Klinik und histologisches Bild in vielen Fällen, besonders in den frühen Phasen der Krankheit, allein keine sichere Differenzierung zwischen einer Dermatose chronisch-entzündlichen Charakters und einem Malignom zulassen. Ein wichtiges Hilfsmittel, zusammen mit Histologie und Immunophänotypisierung, ist die Bestimmung der Klonalität des B-Zellinfiltrats mit Hilfe molekularbiologischer Methoden.

Ziel der Arbeiten ist die Etablierung eines molekularbiologischen Verfahrens zur Analyse der Klonalität von B-Zellinfiltraten vor allem in Paraffin eingebetteten Gewebeproben. Die Validität der gewonnenen Aussagen im Vergleich zu Klinik und Histologie soll beurteilt werden.

Aufgrund der verschiedenen publizierten Methoden sollen mehrere PCR-Techniken unter folgenden Fragestellungen verglichen werden:

1. Es sollen durch Literaturrecherche mögliche IgH-Primersysteme für die Routineanalyse gefunden werden. Dazu sollen Untersuchungen zum Primerdesign mit Hilfe der Simulationssoftware *Oligo 5.0* durchgeführt werden. Die ausgewählten Systeme werden dann zunächst an benignen Haut- bzw. Blutproben auf Funktionalität getestet.
2. Für die Identifizierung klonaler PCR-Produkte soll die Kapillarelektrophorese an einem automatischen DNA-Sequenzierer (Genescan) angewandt werden. Um eine objektive Auswertung zu ermöglichen, müssen einheitliche Kriterien für die Beurteilung eines Genescanprofils erarbeitet werden.
3. Die Ergebnisse der etablierten PCR sind mit den histologischen und klinischen Daten zu korrelieren.
4. Weiterhin soll ein Vergleich der verschiedenen Primer-Systeme erfolgen. Führt die Verwendung von Primersystemen für verschiedene IgH FR-JH-Bereiche zu einer Steigerung der diagnostischen Sensitivität? Wie spezifisch sind die verschiedenen PCR?
5. Die Vergleichsuntersuchungen sollen an Material von Patienten mit kutanem B-Zell-Lymphom durchgeführt werden. Zusätzlich ist für den Vergleich der PCR-Systeme eine Sensitivitätsbestimmung vorgesehen.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

2.1.1 Patienten

Untersucht wurden in flüssigem Stickstoff gefrorene oder in Paraffin eingebettete Biopsien aus Hautläsionen von insgesamt 79 Patienten der Dermatologischen Klinik der Charité, der Pathologie der Charité und auswärtigen Einsendern. Alle Proben wurden zur Gegenüberstellung von Klinik bzw. Histologie und Molekularbiologie nach folgenden Kriterien in drei Gruppen eingeteilt:

2.1.1.1 Gruppe 1: CBCL-Patienten

In diese Gruppe wurden alle Patienten aufgenommen, bei denen ein CBCL klinisch und histologisch sicher diagnostiziert war. Die Gruppe umfasst 51 CBCL-Patienten darunter 20 Patienten mit FCCL, fünf mit einem MZL/IC, zwei mit einem CBCL der unt. Extr. und 24 Patienten mit unklassifizierten CBCL.

Von einigen Patienten standen mehrere Proben zur Untersuchung zur Verfügung, so dass insgesamt 63 Proben (27 FCCL, 6 MZL/IC, 3 CBCL der unt. Extr., 27 unklassif. CBCL) analysiert wurden.

2.1.1.2 Gruppe 2: Kontrollen

In Gruppe 2 wurden 22 Patienten eingeordnet, bei denen histologisch und klinisch ein CBCL sicher ausgeschlossen war und denen eine Hautprobe aufgrund einer anderen Diagnose entnommen wurde.

Gruppe 2 enthielt auch CLH, z.B. Pseudolymphome oder Insektenstichreaktionen d.h. Krankheitsbilder, bei denen inkonstant monoklonale Infiltrate beschrieben wurden (Santucci et al. 1991, Rijlaarsdam et al. 1992, Baldassano et al. 1999, Kempf et al. 1999, Bouloc et al. 1999, Hughes et al. 2001).

Die klinische Diagnose wurde in der Sprechstunde für kutane Lymphome der Charité gestellt. Die histologischen Untersuchungen erfolgten durch Frau Oberärztin Dr. Audring, Fachärztin für Pathologie und Laborleiterin des histologischen Labors der Hautklinik der Charité.

2.1.1.3 Gruppe 3: Nicht primär kutane Lymphome

In Gruppe 3 wurden Patienten eingeordnet, die an einem systemischen Lymphom erkrankt waren. (6 Patienten: 4 Proben unterschiedlicher Lokalisation aus der Pathologie der Charité, 1 Hautprobe, PBMC (siehe Abschnitt 2.2.1) einer MF - Patientin aus der Dermatologie der Charité).

2.1.2 Geräte

- Schüttelwasserbad 1083, GFL
- Metallblock-Thermostat DB 2P, thermo-DUX
- Tischzentrifuge, Eppendorf
- Thermocycler T3, Biometra
- TGGE Maxi-System, Biometra
- Agarosegelsystem, "Micro", Bio Tec Brand
- Kälte-Umwälzthermostat F10-MH, Julabo
- Automatisches DNA-Kapillarsequenzengerät ABI 310 Prism, Applied Biosystems

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Pufferlösungen

- PBS: 1,7mM NaCl; 0,064mM KCl; 0,375% Tris-Base; 0,002% Phenolrot; pH 7,4
- Ficoll-Pâque plus: Amersham Pharmacia Biotech Inc
- MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS (pH 7,0); 50mM Natriumacetat; 5mM EDTA, pH 8,0
- TBE: 89mM Tris-Base; 89mM Borsäure; 2mM EDTA; pH 8,0
- Extraktionspuffer: 50mM KCl; 10mM Tris/HCl; 0,45% nonidet-P40; 0,45% Tween20; pH 8,3
- Ladepuffer (10x): 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 15% Ficoll
- PCR-Kits: (jeweils mit 10x PCR-Buffer und MgCl₂)
- AmpliTaQ Gold: Part No.: 4311814, Applied Biosystems
- Ampli Taq: Part No.: N804-0153, Applied Biosystems
- dNTP-Set: Amersham Pharmacia Biotech Inc
- Agarose: Life Technologies
- 2% Agarose: 2% Agarose in 1x TBE-Puffer; 0,5µg/µl Ethidiumbromid
- Größenstandard: 100bp DNA Ladder, Invitrogen life technologies
- Polyacrylamidgel:
- für die TGGE: 8% Polyacrylamid in 1x MOPS-Puffer; 8M Harnstoff; 0,05% Glycerin; 0,06% Ammoniumpersulfat; 0,06% TEMED
- Genescan:
- Größenstandard: Genescan 500TM ROX, PE Applied Biosystems
- Formamid: Merck
- Polymer: Performance Optimized Polymer 6 (POP6), Applied Biosystems
- Pufferlösung: Buffer 10x, Applied Biosystems

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolation

Von in Paraffin konserviertem Gewebe (Hautbiopsat) wurden 10 Schnitte mit 10 µm Dicke angefertigt. Durch zweimalige Extraktion in je 1 ml Xylol, gefolgt von je 1 ml Äthanol (96 %) wurde deparaffinisiert. Nach der Trocknung im Vakuum erfolgte der DNA-Aufschluß (s.u.).

Zur Gewinnung von PBMC, d.h. mononukleären Zellen aus peripheren Blut für die Funktionskontrollen wurden aus 20 ml heparinisiertem Blut Zellen mittels Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten (20 min bei 2400 U/min) gewonnen. Nach der Reinigung der abgetrennten Zellen durch zweimalige Zentrifugation (10 min, 1100 U/min) in PBS wurden die Zellen der DNA-Präparation zugeführt.

Die PBMC, deparaffinisiertes Gewebe oder zerkleinertes, gefrorenes Gewebe (Kryoproben) wurden nach Aufnahme in den Extraktionspuffer unter Zusatz von 40 µg Proteinase K 16 Stunden bei 55 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms für 15 min bei 95 °C. Fünf µl des Ansatzes wurden in der PCR eingesetzt.

2.2.2 PCR-Grundlagen

2.2.2.1 Verschiedene Reaktionsgemische (RG)

1. Die Reaktionsgemische (50 µl) enthielten 10fach-PCR-Puffer; 4 mM MgCl₂; 200 µM je dNTP; 0,667 µM je Primer; 2,25 U Taq Polymerase und 5µl DNA.
2. Wie 1. nur mit Ampli Taq Gold-Polymerase anstelle der Ampli Taq-Polymerase.
3. Reaktionsgemisch für die geschachtelten PCR-Systeme: Wie 1. nur mit Ampli Taq Gold-Polymerase anstelle von Ampli Taq-Polymerase. In der 1. Runde wurden 5µl DNA zugesetzt, in der 2. Runde 1µl Amplifikat aus der 1. Runde.

Die Ampli Taq Gold-Polymerase ist eine sogenannte „Hot start Polymerase“, die erst bei 95 °C aktiviert wird. Somit wird die Elongation von eventuell vorhandenen Primerdimeren bzw. Haarnadeln vor dem Start der PCR verhindert.

Für die Fragmentanalyse wurden mit 5-Carboxy-Fluoreszin markierte Primer (JH-FAM) eingesetzt.

2.2.2.2 PCR-Programme

Es handelt sich bei allen Programmen um eine Standard-PCR mit den drei Schritten:

1. Denaturierung, 2. Anlagerung, 3. Extension.

Die Zeitdauer und die benötigten Temperaturen der einzelnen Schritte sind in der Tab. 3 wiedergegeben.

Tab. 3: Verwendete PCR-Programme (PCR-Prog.):

			1 Zyklus besteht aus:			
PCR-Programm:	erste Denaturierung	Zyklenzahl:	Denaturierung	Anlagerung	Extension	abschließende Extension
1	4 min 95°C	30	1 min 95°C	1min 57°C	1 min 72°C	5 min 72°C
2	10 min 95°C	42	1 min 95°C	2 min 68°C	1 min 72°C	7 min 72°C
3	9 min 94°C	5	10 sec 94°C	1 min 53°C	1 min 72°C	7 min 72°C
		10	10 sec 94°C	30 sec 55°C	30 sec 72°C	
		30	15 sec 94°C	30 sec 57°C	30 sec 72°C	
4	9 min 95°C	30	1 min 95°C	1 min 55°C	1 min 72°C	4 min 72°C
5	9 min 95°C	30	1 min 95°C	1 min 52°C	1 min 72°C	4 min 72°C
6	10 min 95°C	40	1 min 94°C	1,5 min 56°C	1 min 72°C	7 min 72°C
7	7 min 95°C	33	1 min 95°C	1 min 66°C	1,5 min 72°C	5 min 72°C
8	5 min 94°C	4	15 sec 94°C	1 min 64°C	1 min 72°C	7 min 72°C
		4	15 sec 94°C	1 min 62°C	1 min 72°C	
		30	15 sec 94°C	1 min 60°C	1 min 72°C	
9	7 min 95°C	30	1 min 95°C	1 min 60°C	1,5 min 72°C	4 min 72°C

2.2.3 FR3-PCR-Systeme

Die erwartete Produktlänge liegt bei 60-130bp.

Eine Übersicht über die bisher beschriebenen FR3- bzw. JH-Primer gibt die Tab. 4:

Tab. 4: Die in der Literatur am häufigsten verwendeten FR3- und JH-Primer

FR 3	Autor	Sequenz																	Codons
VH	MC Carthy et al. 1990								CTG	TCG	AGA	CGG	CCG	TGT	ATT	ACT	G		87-95
FR3A	Hayashi et al. 1999								CTG	TCG	ACA	CGG	C(C/T)(G/C)	TGT	ATT	ACT	GT		87-95
FR3	Brisco et al. 1990										ACA	CGG	C(C/T)(G/C)	TGT	ATT	ACT	GT		89-95
FR3	Lehmann et al. 1995										ACA	CGG	CCG	TGT	ATT	ACT	GT		89-95
VH26	Fodinger et al. 1999										A	CGG	CCC	TGT	ATT	ACT	G		89-95
V 670	Fodinger et al. 1999	AAC	AGC	CTG	AGA	GCC	GAG	GA											80-86
RE1-FR3	Inghirami et al. 1993		*	<i>G</i>	<i>GTG</i>	<i>GAT</i>	<i>CGA</i>	<i>TGA</i>	<i>ATT</i>	<i>CTT</i>	ACA	CGG	C(C/T)(G/C)	TGT	ATT	ACT	GT		89-95
RE1	Inghirami et al. 1993		*	<i>G</i>	<i>GTG</i>	<i>GAT</i>	<i>CGA</i>	<i>TGA</i>	<i>ATT</i>	<i>CTT</i>									
FR3.1	Kitamura et al. 1996									G	AC(A/T)	C(A/G)G	C(G/C)(G/A)	TGT	A(T/C)T	(T/A)CT	G		89-95
FR3.2	Kitamura et al. 1996										ACA	CGG	C(C/T)(G/C)	TGT	ATT	ACT	GT		89-95

* kursiv gedruckter Teil entspricht einer Restriktionssequenz

JH Primer	Autor	Sequenz																	Codons
<u>ungeschachtelt:</u>																			
JH cons.	MC Carthy et al. 1990					AAC	TGC	AGA	GGA	GAC	GGT	GAC	C						105-112
JH	Inghirami et al. 1993					AAG	CTT	TGA	GGA	GAC	GGT	GAC	CA						105-112
JH-RE2	Inghirami et al. 1993	G	GAT	GGT	ACC	AAG	CTT	TGA	GGA	GAC	GGT	GAC	CA						105-112
JH	Deane und Norton 1990						ACC	TGA	GGA	GAC	GGT	GAC	CAG	GGT					106-112
Jhcons	Aubin et al. 1994						ACC	TGA	GGA	GAC	GGT	GAC	C(A/G)(G/T)	(G/T)GT					106-112
JH 1,2,4,5	Aubin et al. 1994	entspricht JH-Primer von Deane und Norton 1991																	106-112
JH 3	Aubin et al. 1994					T	ACC	TGA	AGA	GAC	GGT	GAC	CAT	TGT					105-112
JH 6	Aubin et al. 1994						ACC	TGA	GGA	GAC	GGT	GAC	CGT	GGT					106-112
JH	Galimberti et al. 1999						ACC	TGA	GGA	GAC	GGT	GAC	CA						106-112
JH	Bouloc et al. 1999						ACC	TGA	GGA	GAC	GGT	GAC	C						106-112
<u>geschachtelt:</u>																			
LJH	Brisco et al. 1990							TGA	GGA	GAC	GGT	GAC	C						107-112
VLJH											GT	GAC	CAG	GGT	NCC	TTG	GCC	CCA	G
LJH	Trainor et al. 1991						ACC	TGA	GGA	GAC	GGT	GAC	C						106-112
VLJH											GT	GAC	CAG	GGT	NCC	TTG	GCC	CCA	G
BJ-outer	Kitamura et al. 1996					CTT	ACC	TGA	GGA	GAC	GGT	GA							105-111
BJ-inner											GT	GAC	CAG	GGT	NCC	TTG	GCC	CCA	G
LJH	Hayashi et al. 1999					AAC	TGC	AGA	GGA	GAC	GGT	GAC	C						105-112
VLJH (JH 1-5)	Hayashi et al. 1999								AA	GCT	TGT	GAC	CAG	GGT	(G/T/C)				103-109
VLJH(JH6)	Hayashi et al. 1999								AA	GCT	TGT	GAC	CGT	GGT	CCC	TTG	C		103-109

Die in dieser Arbeit eingesetzten PCR-Systeme sind in Tab. 5 aufgelistet:

Tab. 5: Aufstellung der durchgeführten PCR für FR3

PCR mit Konsensusprimern (cons), ungeschachtelt (s)				
PCR	FR3-Primer	JH-Primer	Reaktionsgemisch	PCR-Programm
3.1	BRI90	GAL99	1	1
3.2	HAY99	ING93	1	1
3.3	FOD99	GAL99	2	2
3.4*	LEH95	MCC90	1	1
3.1b	BRI90	GAL99	2	3
PCR mit Konsensusprimern, halbggeschachtelt (sn)				
PCR	FR3-Primer	LJH/VLJH-Primer	Reaktionsgemisch	PCR-Programm
3.5	BRI90	BRI90	3	4
3.6	HAY99	HAY99	3	5
PCR mit Konsensusprimern, sn				
PCR	FR3.1/3.2-Primer	JH-Primer	Reaktionsgemisch	PCR-Programm
3.7	RE1-FR3/RE1 ING93	JH-RE2	3	6

*zur Zeit durchgeführte PCR im Lymphomlabor der Dermatologie

2.2.4 FR1-PCR-Systeme

Die erwartete Produktlänge liegt bei 280-340bp. Eine Übersicht über die FR1-Primer gibt Tab.6:

Tab. 6: Die in der Literatur am häufigsten verwendeten FR1-Primer

Deane und Norton 1991												Codons		
FR1.1			CCT	CAG	TGA	AGG	TCT	CCT	GCA	AGG		CA	16-24	
FR1.2			TCC	TGC	GCT	GGT	GAA	AGC	CAC	ACA			8-16	
FR1.3			GGT	CCC	TGA	GAC	TCT	CCT	GTG	CA			16-23	
FR1.4a			TC	GGA	GAC	CCT	GTC	CCT	CAC	CTG			14-22	
FR1.4b			CGC	TGT	CTC	TGG	TAA	CTC	CAT	CAG			22-30	
FR1.5			GAA	AAA	GCC	CGG	GGA	GTC	TCT	GAA			11-19	
FR1.6			CCT	GTG	CCA	TCT	CCG	GGG	ACA	GTG			20-28	
Küppers et al. 1994														
FR1.1			CCT	CAG	TGA	AGG	T(C/T)T	CCT	GCA	AGG			16-25	
FR1.2		G	TCC	TGC	GCT	GGT	GAA	ACC	CAC	ACA			7-16	
FR1.3		GG	GGT	CCC	TGA	GAC	TCT	CCT	GTG	CAG			15-23	
FR1.4					GAC	CCT	GTC	CCT	CAC	CTG	C(G/A)C	TGT	C	16-24
FR1.5			AA	AAA	GCC	CGG	GGA	GTC	TCT	GA(A/G)	GA			11-20
FR1.6	entspricht FR1.6 Deane und Norton 1991													
Aubin et al. 1995														
FR1.1	entspricht FR1.1 Deane und Norton 1991													
FR1.2	entspricht FR1.2 Deane und Norton 1991													
FR1.3						C	TCT	CCT	GTG	CAG	CCT	CTG	G	19-26
FR1.4a							T	GTC	CCT	CAC	CTG	C(G/A)(T/C)	TG	
FR1.5	entspricht FR1.5 Deane und Norton 1991													
FR1.6	CT	CAC	TCA	CCT	GTG	CCA	TC							17-23
Marks et al. 1991														
HVH1			CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	G			ca. 4-11	
HVH2			CAG	GTC	AAC	TTA	AGG	GAG	TCT	G				
HVH3			GAG	GTG	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	G				
HVH4			CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	G				
HVH5			GAG	GTG	CAG	CTG	CTG	CAG	TCT	G				
HVH6			CAG	GTA	CAG	CTG	CAG	CAG	TCA	G				
Aubin et al. 1995														
FR1,cons			AG	GTG	CAG	CTG	(G/C) (A/T)G	(G/C) AG	TC (G/A/T)	GG			ca. 4-11	

kursiv: Unterschiede in der Sequenz

Die von uns angewandten PCR-Systeme für FR1 sind in Tab. 7 dargestellt:

Tab. 7: Aufstellung der durchgeführten PCR für FR1

PCR mit fam- Primern, multiplex-alle fam Primer in einem Ansatz, sn				
PCR	FR1-Primer	JH-Primer	Reaktionsgemisch	PCR-Programm
1.1	KÜP91	GAL99	2	1
PCR mit fam- Primern, multiplex, n				
PCR	FR1-Primer 1./2.Runde	LJH/VLJH-Primer	Reaktionsgemisch	PCR-Programm
1.2	AUB95/KÜP94	BRI91	3	4

2.2.5 Leader-PCR-Systeme

Die erwartete Produktlänge liegt bei 450-550bp.

Eine Übersicht über die bisher beschriebenen Leader(LEA)-Primer gibt die Tab. 8:

Tab. 8: Die in der Literatur am häufigsten verwendeten LEA-Primer

Campbell et al. 1992										
VH1(CAM92)	C	ACA	CCA	TGG	ACT	GGA	CCT	GGA	G	
VH2(CAM92)			ATG	GAC	ATA	CTT	TGT	TCC	AGG	CTC
VH3(CAM92)			CCA	TGG	AGT	TTG	GGC	TGA	GCT	GG
VH4(CAM92)		AC	ATG	AAA	CAY	CTG	TGG	TTC	TTC	C
VH5(CAM92)			ATG	GGG	TCA	ACC	GCC	ATC	CTC	G
VH6(CAM92)			ATG	TCT	GTC	TCC	TTC	CTC	ATC	TTC
Inghirami et al. 1993										
VH1(ING93)			CCA	TGG	ACT	GGA	CCT	GGA	GG	
VH2(ING93)			ATG	GAC	ATA	CTT	TGT	TCC	AG	
VH3(ING93)			CCA	TGG	AGT	TTG	GGC	TGA	GC	
VH4(ING93)			ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TT	
VH5(ING93)			ATG	GGG	TCA	ACC	GCC	ATC	CT	
VH6(ING93)			ATG	TCT	GTC	TCC	TTC	CTC	AT	

kursiv: Unterschiede in der Sequenz

Die von uns angewandten PCR-Systeme für die Leader-Region sind in Tab. 9 dargestellt:

Tab. 9: Aufstellung der durchgeführten PCR für die LEA-Region

PCR mit fam Primern, pro Ansatz nur einer der 6 fam Primer, s				
PCR	LEA-Primer	JH-Primer	Reaktionsgemisch	PCR-Programm
LEA.1	CAM92	DEA90	2	7

2.2.6 FR2-PCR-Systeme

Die erwartete Produktlänge liegt bei 220-280bp.

Für den FR2-Lokus sind in der Literatur zwei verschiedene Primer beschrieben:

Tab. 10: Die in der Literatur am häufigsten verwendeten FR2-Primer

FR 2	Autor	Sequenz											Codon	
FR2.1	Ramasamy et al. 1992	TGG	(A/G)TC	CG(C/A)	CAG	(G/C)C(T/C)	(T/C)CN	GG						36-42
FR2.2	Ramasamy et al. 1992		GTC	CTG	CAG	GC(C/T)	(C/T)CC	GG(A/G)	AA(A/G)	(A/G)GT	CTG	GAG	TGG	37-47
FR2.1	Kitamura et al. 1996	TGG	(A/G)TC	CG(C/A)	CAG	(G/C)C(T/C)	(T/C)C							36-41
FR2.2	Kitamura et al. 1996		GTC	CTG	CAG	GC(C/T)	(C/T)CC	GG(A/G)	AA(A/G)	(A/G)GT	CTG	GAG		37-46

Die von uns angewandten PCR-Systeme für die FR2-Region sind in Tab. 11 dargestellt:

Tab. 11: Aufstellung der durchgeführten PCR für FR2

PCR mit cons-Primern, s				
PCR	FR2-Primer	JH-Primer	Reaktionsgemisch	PCR-Programm
2.1	RAM92 (FR2.1)	GAL99	1	1
PCR mit cons-Primern, sn				
PCR	FR2-Primer	LJH/VLJH-Primer	Reaktionsgemisch	PCR-Programm
2.2	RAM92 (FR2.1)	BRI91	3	4
PCR mit cons-Primern, n				
PCR	FR2-Primer 1./2.	LJH/VLJH-Primer	Reaktionsgemisch	PCR-Programm
2.3	KIT96 (FR2.1/2.2)	KIT96	3	9

2.2.7 Die IgL-PCR

Es wurde nur für die κ -Kette eine PCR durchgeführt.

Die erwartete Produktlänge liegt bei 120-150bp.

Folgende Primer kamen zum Einsatz:

FR3 κ (Gong et al. 1999): 5' TTC AG(C/T) GGC AGC GG(A/G) TCT GGG 3' Codons 62-68

JH κ (Gong et al. 1999): 5' CA(G/C) CTT (G/T)GT CCC (C/T)TG GCC GAA 3' Codons 98-104

Reaktionsgemisch: 1, PCR-Programm: 8

2.2.8 Agarosegelelektrophorese (AGE)

Die Überprüfung der PCR-Amplifikation erfolgte durch Elektrophorese in 2%igem Agarosegel mit Zusatz von Ethidiumbromid. Dann wurden jeweils 8 μ l des PCR-Produkts mit 2 μ l Ladepuffer aufgetragen, in 1x TBE-Puffer bei 60 V eine Stunde aufgetrennt und anschließend bei UV-Durchleuchtung fotografiert.

In der Agarose darstellbare PCR-Produkte wurden im Anschluss sowohl mit Genescan-Analyse als auch in der TGGE analysiert.

2.2.9 Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE)

Es wurden 5 μ l PCR-Produkt mit 0,5 μ l Ladepuffer auf die TGGE aufgetragen. Mit dem TGGE-System „Maxi“ (Biometra, Göttingen) erfolgte die Separation entsprechend dem Protokoll der Hersteller (Quiagen 1994) und mit einem Gradienten von 20 °C bis 55 °C bei 300–350 V, 2:40 h Laufzeit und anschließender Silberfärbung.

2.2.10 Kapillarelektrophorese (Genescan)

12 μ l deionisiertes Formamid, 0,8 μ l Größenstandard (Genescan 500TM ROX) und 1 μ l fluoreszenzmarkiertes PCR-Produkt wurden 2 min bei 95°C denaturiert und darauf in Eis abgekühlt, um einzelsträngige DNA zu erhalten.

Anschließend wurden die Proben im automatischen DNA-Kapillarsequenzengerät ABI Prism 310 separiert und analysiert: Nach einer Injektionszeit von 5 Sekunden erfolgte die Elektrophorese bei 60°C und 15kV in einer 47cm langen, mit POP6-Gel gefüllten Kapillare. Die Separationszeit

betrug 25 min für die FR3-PCR und 36 min für alle anderen PCR.

Die Auswertung erfolgte mit der GeneScan 372 Software (PE Applied Biosystems), wie im Handbuch beschrieben.

2.2.11 Primeranalyse im Oligo

2.2.11.1 Anforderungen an geeignete PCR-Primer

Ein optimaler PCR-Primer soll effizient an der Ziel-DNA binden, dabei aber keine unspezifischen Bindungen mit der DNA oder anderen Primern eingehen. Ausserdem müssen die Bindungseigenschaften der Primer möglichst ähnlich sein, um einen asymmetrischen PCR-Verlauf zu vermeiden. Asymmetrisch bedeutet, dass die Bedingungen für eine suffiziente Bindung an die DNA für den einen Primer gut sind, für den anderen aber schlecht und somit die Bildung des Amplifikates nicht in ausreichender Menge erfolgen kann.

2.2.11.2 Unspezifische Doppelstrang-Bildung mit der Ziel-DNA

Da das menschliche Genom ca. 3,5 Milliarden Basenpaare enthält (Bachmann 1986), ist die Entwicklung eines Primers, der nur eine effiziente Bindungsstelle an der Ziel-DNA besitzt, nahezu unmöglich. Es wird immer Sequenzabschnitte im Genom geben, die der Zielsequenz für die Primerbindung so ähneln, dass der Primer an der falschen Stelle bindet. Ist das 3'Ende an der Doppelstrangbildung beteiligt, kommt es zur Verlängerung des Primers an der unspezifischen Sequenz. Kommt es zur Anlagerung im 5'Bereich, ohne Bindung am 3'Ende, unterliegt der Primer keinen Veränderungen.

2.2.11.3 Effiziente Doppelstrangbildung mit der Ziel-DNA

Ein Maß für die Stabilität des Doppelstrangs zwischen Primer und DNA-Fragment ist die Änderung der freien Enthalpie (dG). Je größer der Betrag der Abnahme der freien Enthalpie ist, desto höher ist die Stabilität der entstehenden Verbindung (Rychlik und Rhoads 1989). Da bei der Ausbildung der drei Wasserstoffbrücken zwischen Guanin und Cytosin mehr Energie frei wird als bei der Bildung der zwei Wasserstoffbrücken zwischen Adenin und Thymin, ist Stabilität des DNA-Doppelstranges anhand des Prozentsatzes vorhandenen Guanins und Cytosins zu bestimmen (Breslauer et al. 1986). Das *Oligo-Programm* berechnet daraus die interne Stabilität des Primers. Von besonderer Bedeutung ist die Sequenz am 3' Ende des Primers. Eine Verlängerung des Oligonukleotids durch die Taq-Polymerase erfolgt immer dann, wenn dieser Teil an ein einzelsträngiges DNA-Molekül gebunden ist.

Optimale Primer sollen eine hohe Stabilität im 5' Bereich haben (großes dG) und eine geringe Stabilität im 3' Bereich (kleines dG). Wäre dG am 3' Ende hoch, so könnte es unabhängig von den Bindungen am 5' Ende zur Extension kommen. Damit sinkt die Spezifität des Primers, da zur Extension nicht die vollständige Anlagerung erforderlich ist. Das hohe dG im 5' Bereich ist

nötig, damit der Primer dennoch effizient binden kann. Eine weitere Möglichkeit, die Stabilität der Primer-DNA-Doppelstränge zu ermitteln, ist die Berechnung der Schmelztemperaturen der jeweiligen Oligonukleotide. Eine große Differenz erschwert eine effiziente und spezifische PCR. Wird die Anlagerungstemperatur in den Bereich des Primers mit der höheren Schmelztemperatur gelegt, kann der Primer mit der niedrigen Schmelztemperatur nicht in ausreichendem Maße binden, die PCR verläuft ineffizient. Im umgekehrten Falle kommt es neben der effizienten Anlagerung des Primers B zu vermehrten unspezifischen Doppelstrangbildungen des Primers A mit dem höheren Schmelzpunkt.

2.2.11.4 Doppelstrang-Bildung zwischen Primern

Auch die unerwünschten Bindungen zwischen Primern lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

1. Mindestens ein 3'Ende eines Primers ist in die Doppelstrangbildung einbezogen, es kommt zur Verlängerung dieses Primers (bei Beteiligung beider 3' Enden kommt es zur exponentiellen Vermehrung)
2. Es kommt außerhalb der 3'Enden zur Ausbildung eines Doppelstranges. Nach erneuter Denaturierung stehen die Primer wieder der spezifischen Reaktion zur Verfügung

Einen Sonderfall stellt die Doppelstrangbildung innerhalb eines Primers dar. Auch bei der Ausbildung dieser sogenannten Haarnadelstrukturen liegt der Beteiligung des 3'Endes eine besondere Bedeutung bei, da sie zur Primerverlängerung führt. Haarnadelstrukturen ohne Beteiligung des 3'Endes beeinflussen die PCR-Ausbeute dagegen kaum.

Die für die Analysen der einzelnen Primer gewählten Parameter wurden in Anlehnung an die in *OLIGO 5.0* empfohlenen Parameter für eine hochstringente Primersuche gewählt:

3'Dimere:	statthaft, wenn $dG > -3,5 \text{ kcal/mol}$
weitere Dimere:	statthaft, wenn $dG > -7,5 \text{ kcal/mol}$
Haarnadelstruktur:	statthaft, wenn $dG > 0 \text{ kcal/mol}$
interne Stabilität:	maximaler Wert für dG im 3'Bereich = $-7,7 \text{ kcal/mol}$

Wenn mehr als zwei Primer an einer PCR beteiligt sind, wurden die Primer im Multiplex-Programm des *Oligo* auf Doppelstrangbildungen untereinander untersucht. Dort hatten die Primer die Anforderungen „high“ bzw. „moderate“ zu erfüllen (s. Tab. 12):

Tab. 12: Anforderungen an die Primer im Multiplex-Programm des *Oligo*

Anforderung	moderate	high
-Minimale Basenlänge der Primer:	21 bp	21 bp
-Maximales dG der 3' Dimere:	-3.7 kcal/mol	-3,5 kcal/mol
-Anzahl der bp, die am Dimer beteiligt sind:	max. 6bp	max. 4bp
-3' Ende, das auf 3' Dimere untersucht wurde:	7bp	12bp
-Maximales dG für Haarnadeln:	-0.8 kcal/mol	0 kcal/mol
-3' terminale Stabilität im Bereich von:	-9.8 - -5.5 kcal/mol	-9.8 bis -5.5 kcal/mol
M – Multiplexed	-bedeutet, dass der Primer mit allen andern Primern kompatibel ist (unter den angegebenen Bedingungen)	
NC - nicht kompatibel	-bedeutet, dass der Primer mit einem oder mehreren der anderen Primer nicht kompatibel ist (unter den angegebenen Bedingungen)	
D – Dimer	bedeutet, dass der Primer nicht mit den anderen getestet werden kann, da er in sich schon ein 3'Dimer mit einem dG bildet, das die max. Grenze übersteigt	

Bei einigen Multiplex-Analysen musste der Betrag des maximalen dG der 3'-Dimere noch erhöht werden, um alle Primer in die Multiplex Analyse einzuschließen. Die Änderungen werden bei der jeweiligen Abbildung angegeben.

Des weiteren wurde die Schmelztemperatur der einzelnen Oligonukleotide berechnet und verglichen. Grundlage hierfür waren die Verfahren nach *Breslauer et al* (1986) ($2(A+T)^{\circ}+4(G+C)^{\circ}$ -Methode) und *Wetmur (Nearest-Neighbor-Method)* (Rychlik et al. 2000). Als maximale Differenz der Schmelztemperaturen haben wir 10°C festgelegt. Bei Unterschieden der mit den beiden Verfahren berechneten Differenzen wurde für die Bewertung das Ergebnis nach der *Nearest-Neighbor-Method* zugrunde gelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Definition von Klonalität

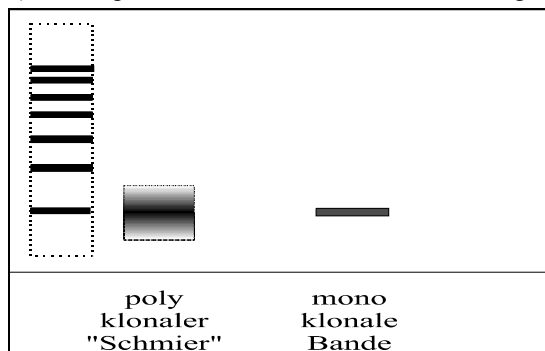
Polyklonale Amplifikate von Patienten mit entzündlichen Hautinfiltraten oder peripheren Blut von Gesunden bilden ein breites, unscharfes Band (sog. „Schmier“) in der TGGE.

Bei der Fragmentanalyse führen polyklonale PCR-Produkte zu einem Gauß-Kurven ähnlichen Muster. Benachbarte Peaks entsprechen unterschiedlichen Fragmenten, die sich, da das IgH-Gen in Frame rearrangiert, in ihrer Länge durch jeweils drei Basen unterscheiden.

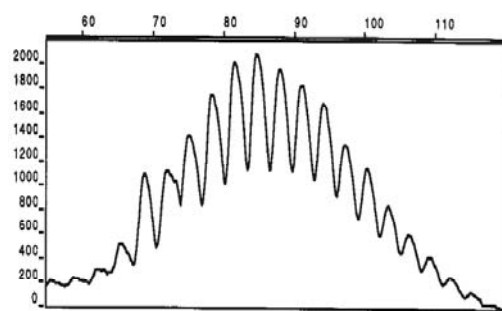
Amplifikate der monoklonalen Zellreihe JY bilden auf der TGGE eine scharfe Bande, und in der Fragmentanalyse einen dominanten Peak. (Abb. 3)

Abb. 3: Darstellung polyklonal bzw. monoklonaler Amplifikate

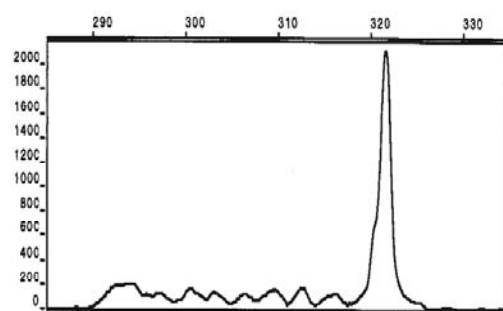
a) Elektrophoresebild: schematische Darstellung



b) Genescanprofile:



polyklonales Profil



monoklonales Profil

In der TGGE wurde eine Probe als klonal eingeschätzt, wenn sie eine reproduzierbare scharfe Bande hinterließ.

Im Genescan galt eine Probe als klonal, wenn sie in zwei voneinander unabhängigen PCR einen einzelnen, deutlich von einem möglichen polyklonalen Hintergrund abgrenzbaren Peak gleicher Größe zeigte. Um den Peak als sicher monoklonal einstufen zu können, wurde folgende Formeln zur Berechnung verwendet:

Berechnung der „Ratio“:

$$\frac{h^1}{(h^2 + h^3/2)}$$

(Lukowsky et al. 2002)

Berechnung des „Peak under the curve“:

$$\frac{h^1}{\sum (h^a/a)}$$

(Lukowsky et al. 2002)

- h^1 : Höhe des klonalen Peak
- h^2 : Höhe des rechts benachbarten Peak
- h^3 : Höhe des links benachbarten Peak
- h^a : Höhe aller Peaks
- a : Anzahl der Peaks

Die „Ratio“ setzt den dominierenden Peak ins Verhältnis zu seinen beiden benachbarten Peaks und muss, nach unseren Erfahrungen, >2 sein. Peaks mit einer Ratio von 1,8-2,0 wurden als unsicher monoklonal eingestuft. Die Berechnung des „Peak under the curve“ setzt den abgrenzbaren Peak ins Verhältnis zur durchschnittlichen Peakhöhe des gesamten Profils. Das Ergebnis muss >1 betragen.

PCR-Amplifikate einiger CBCL-Patienten, bei denen beide IgH-Allele rearrangiert im B-Zell-Klon vorlagen, zeigten sich zwei scharfe Banden bzw. zwei klonale Peaks in der TGGE bzw. im Genescan. Sie wurden ebenfalls zu den klonalen Fällen gezählt.

Wenn sich in der Fragmentanalyse ein Muster zeigte, das weder als monoklonal, noch als polyklonal einzuordnen war, mit drei bis sechs dominierenden Peaks, so wurden diese Fälle als oligoklonal eingestuft. Meistens waren diese Peaks bei der Wiederholung der PCR jedoch nicht reproduzierbar. Das heißt die abgrenzbaren Peaks hatten nun eine andere Basenpaarlänge, die Ergebnisse sind „pseudo-oligoklonal“.

Bei einigen CBCL-Patienten zeigte der klonale Peak bei der Wiederholung der Analyse unterschiedliche Fragmentlängen. Bei anderen war die Probe in der ersten Analyse oligoklonal und in der zweiten Analyse monoklonal oder umgekehrt. Diese Ergebnisse wurden als pseudoklonal (d.h. als falsch klonal) eingestuft.

Nach Auftrennung mittels AGE ist eine Unterscheidung zwischen monoklonaler Bande und polyklonaler Bande meist nicht möglich (Aubin et al. 1995). Sie ist aber zur Überprüfung einer erfolgreichen Amplifikation sinnvoll.

3.2 Ergebnisse der Suche geeigneter Primersysteme

3.2.1 Die FR3 - PCR in der Übersicht

Für den FR3-Bereich entwickelte *Brisco et al.* bereits 1990 als erste einen cons-Primer und führten eine halb-geschachtelte PCR durch. Sowohl die FR3-Primer als auch die JH-, bzw. LJH/VLJH-Primer wurden im Laufe der Zeit mehrmals variiert (siehe Tab. 4). Ob sn- oder s-PCR, die Sensitivität liegt bei beiden Methoden bei den NHL um 40-80% (Diss et al. 1993,

Albrecht et al. 1993, Height et al. 1996, Signoretti et al. 1999). Die Sensitivität bei der Untersuchung der CBCL ist gering (30-60%) (Ritter et al. 1997, Cerroni et al. 1997, Signoretti et al. 1999).

3.2.1.1 Ergebnisse der Überprüfung der FR3- und JH-Primer im Oligo

Da es Ziel war, für die Routinediagnostik geeignete, einfache und rationelle PCR-Methoden zu finden, wurden zuerst Primersysteme für ungeschachtelte PCR untersucht.

Die Analyse der Primer erfolgte mit dem Programm: *OLIGO 5.0 Primer Analysis Software for Windows*, National Biosciences, Inc., USA. Die für die einzelnen Analysen notwendigen Parameter wurden in Anlehnung an das *OLIGO 5.0* ausgewählt (siehe 2.2.11.4.).

Aufgrund der geringeren Variabilität in der Sequenz der Primer wurden nur die FR3-Primer nach Hayashi et al. (1999), Brisco et al. (1990) und Lehmann et al. (1995) ausgewählt (s.Tab. 4). Der FR3-Primer von Lehmann et al (1995) wird bereits in der Routinediagnostik im Lymphomlabor der Dermatologie der Charité verwendet. Ausserdem wurde der FR3-Primer nach Fodinger et al (1999) VH26 untersucht, da er am VH-Gen eine Bindungsstelle weiter 5' als der FR3-Primer nach Hayashi et al. (1999) oder Brisco et al. (1990) besitzt. Von den JH-Primern wurden zunächst die JH-Primer nach MC Carthy et al. (1990), Inghirami et al. (1993) und Galimberti et al. (1999) ausgewählt. Für die geschachtelten PCR wurden die Primer nach Brisco et al. (1990) und Hayashi et al. (1999) untersucht. Die Ergebnisse zeigt Tab. 13:

Tab. 13: Ergebnisse der Primerprüfung mit *Oligo* für FR3/JH

Primer	Sequenz	Das stabilste 3' Dimer in kcal/mol	Das stabilste Dimer im 5' Bereich in kcal/mol	Haarnadel	T _m in °C	Interne Stabilität, 3'
FR3-Primer						
FR3(BRI90)						
1.*	ACA CGG CCG TGT ATT ACT GT	-3,2	-25,5	0.01 kcal/mol, T _m =25°C	62.6	5.8
2.*	ACA CGG CTG TGT ATT ACT GT	-3,2	-3,2	0.01 kcal/mol, T _m =25°C	57.2	5.8
3.*	ACA CGG CCC TGT ATT ACT GT	-3,2	-9,3	1.10 kcal/mol	61.7	5.8
4.*	ACA CGG CTC TGT ATT ACT GT	-3,2	-3,6	1.10 kcal/mol	56.6	5.8
FR3(HAY99)						
1.*	CTG TCG AGA CGG CTC TGT ATT ACT G	keine	-6,8	1.30 kcal/mol	69.9	5.7
2.*	CTG TCG AGA CGG CCC TGT ATT ACT G	keine	-9,3	keine	73.7	5.7
3.*	CTG TCG AGA CGG CTG TGT ATT ACT G	keine	-6,8	keine	70.5	5.7
4.*	CTG TCG AGA CGG CCG TGT ATT ACT G	keine	-19,1	keine	74.4	5.8
FR3(LEH95)	ACA CGG CCG TGT ATT ACT GT	-3,2	-25,5	0.01 kcal/mol, T _m =25°C	62.6	5.8
FR3(FOD99)	AAC AGC CTG AGA GCC GAG GA	-3,1	-6,7	-0,6kcal/mol	69	8,5
JH-Primer						
JH(ING93)	AAG CTT TGA GGA GAC GGT GAC CA	-1,9	-10,1	keine	72.2	6.7
JH(GAL99)	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CA	-1,9	-4,7	-0.20 kcal/mol, T _m =30°C	72.7	6.7
JH(MCC90)	AAC TGC AGA GGA GAC GGT GAC C	-4,4	-10,1	keine	70.1	7.0
LJH(BRI90)	TGA GGA GAC GGT GAC C	-4,4	-4,4	keine	54	6,5
VLJH(BRI90)	GT GAC CAG GGT NCC TTG GCC CCA G	-1,6	-9,8	-2.10 kcal/mol, T _m =68°C	79	6,5
LJH(HAY99)	AAC TGC AGA GGA GAC GGT GAC C	-4,4	-10,1	keine	70	6
VLJH (HAY99;1-5)	AAG CTT GTG ACC AGG GT(G/T/C) CC(T/C) TGG CCC CAG	-1,6	-10,1	-2.10 kcal/mol, T _m =64°C	88	6,5
VLJH (HAY99;6)	AAG CTT GTG ACC GTG GTC CCT TGC CCC CAG	-1,6	-10,1	-0.70 kcal/mol, T _m =41°C	89	6,5

*verschiedene Varianten des Primers, die durch den degenerierten Code entstehen, T_m Schmelztemperatur

Positiv zu bewerten ist, dass alle FR3-Primer keine 3'Dimere über -3,2 kcal/mol und keine

relevanten Haarnadeln bilden.

Auffällig ist die Doppelstrangbildung der Primer nach *Hayashi et al.* (1999) und nach *Brisco et al.* (1990) im 5'-Bereich. Bei den JH-Primern liegt der Primer nach *Mc Carthy et al.* (1990) mit -4,4kcal/mol über dem kritischen dG-Wert für 3' Dimere von 3,5kcal/mol. Die Haarnadel-Bildung beim JH-Primer *Galimberti et al.* (1999) ist mit einer Schmelztemperatur von 30° C zu vernachlässigen, da die *Annealing*-Temperatur während der PCR weitaus höher liegt. Auch bei den JH-Primern kommt es zur relevanten Doppelstrangbildung im 5'-Bereich, da der Primer aber in der nächsten Runde wieder zur Verfügung steht, ist dies von geringerer Bedeutung.

Die LJH/VLJH-Primer nach *Brisco et al.* (1990) und *Hayashi et al.* (1999) liegen bei der Testung ebenfalls häufig über den Normwerten. Besonders die hohe Schmelztemperatur bei den Haarnadeln könnte zu einer geringeren Effizienz der PCR führen.

Die interne Stabilität am 3' Ende war mit Ausnahme des Primers nach *Fodinger et al.* (1999) bei allen Primern unter 7,7 kcal/mol.

Um zu prüfen, ob die Primer untereinander Dimere bilden und welcher JH-Primer am besten geeignet ist, wurden die Primer mit Hilfe der Multiplex-Funktion des *Oligo* getestet. Die Anforderungen an die getesteten Primer und die Bedeutung der Symbole sind unter Punkt 2.2.11.4 bereits erläutert worden.

Die Ergebnisse der Multiplex-Testung des FR3-Primer *Brisco et al.* mit allen untersuchten JH-Primern zeigt die Tabelle 14, die des FR3-Primer *Hayashi et al.* Tab. 15.

Tab. 14: Ergebnisse der Multiplex Testung FR3 (*Brisco et al.* 1990)-PCR3.1

Primer	Moderate	TM in °C
FR3-BRI90 (1)	-3.2 M	57.2
FR3-BRI90 (2)	-3.2 M	56.6
FR3-BRI90 (3)	-3.2 M	61.7
FR3-BRI90 (4)	-3.2 M	62.6
JH-GAL99	-1.9 M	66.8
JH-ING93	-1.9 M	72.2
JH-MCC90	-4.4 D	70.1

(1)-(4)=verschiedene Varianten des Primers, die sich aus der degenerierten Sequenz ergeben

Aufgrund der stärkeren Dimerbildung ist der JH-Primer *Mc Carthy et al.* (1990) als 3'-Primer nicht geeignet. Da die Differenzen der Schmelztemperaturen zwischen den FR3-Primern nach *Brisco et al.* und dem JH-Primer *Galimberti et al.* (1999) am geringsten war, wurde diese Primerkombination für die FR3-PCR 3.1 ausgewählt.

Tab. 15: Ergebnisse der Multiplex-Testung des FR3-Primers (*Hayashi et al. 1999*)-PCR3.2

Primer	High	Tm in °C
FR3 – HAY99 (1)	- M	70.5
FR3 – HAY99 (2)	- M	69.9
FR3 – HAY99 (3)	- M	74.4
FR3 – HAY99 (4)	- M	73.7
JH – ING93	-1.9 M	72.2
JH – GAL99	-1.9 M	66.8
JH – MCC90	-4.4 D	70.1

(1)-(4)=verschiedene Varianten des Primers, die sich aus der degenerierten Sequenz ergeben.

Die Primer dieser Multiplex-Testung erfüllen sogar die Anforderungsstufe „high“. Aufgrund der Schmelztemperaturdifferenz wurde hier der JH-Primer nach *Inghirami et al. (1993)* ausgewählt.

Die Analyse des Primersystems für die FR3-PCR von *Fodinger et al. (1999)* erfolgte entsprechend der Prüfung einzelner Primer im *Oligo*, da hier nur zwei Primer auf Dimerbildung untereinander getestet wurden (Tab. 16).

Tab. 16: Ergebnis der Testung von FR3(FOD99) und JH(GAL99) (PCR3.3)

Primer	Das stabilste 3' Dimer	Das stabilste Dimer im 5'Bereich
FR3 – Fodinger et al (FOD99)	-3,1 kcal/mol	-6,7 kcal/mol
Ergebnis der Testung beider Primer untereinander:	-1,9 kcal / mol	-6,7 kcal / mol
JH – Galimberti et al (GAL99)	-1,9 kcal/mol	-4,7 kcal/mol

Das getestete System entspricht den Anforderungen für hochstringente Primer.

Als Vergleich für die Effizienz und Qualität (evtl. Nebenbanden) sollte die FR3-PCR nach *Lehmann et al. (1995)* dienen, die bereits seit fünf Jahren in der Routine-Diagnostik angewandt wurde. Auch diese Primer wurden, entsprechend der Prüfung einzelner Primer, im *Oligo* getestet:

Tab. 17: Ergebnis der Testung von FR3(LEH95) und JH(MCC90) (PCR 3.4)

Primer	Das stabilste 3'Dimer	Das stabilste Dimer im 5'Bereich
FR3 – Lehmann (LEH95)	-3,2 kcal/mol	-25,5 kcal/mol
Ergebnis der Testung beider Primer untereinander:	-3,5 kcal / mol	-8,0 kcal / mol
JH - Mc Carthy (MCC90)	-4,4 kcal/mol	-10,1 kcal/mol

Diese Primer genügen aufgrund des 3' Dimers des JH-Primers nach *Mc Carthy et al. (1990)*, der 5' Dimere des FR3-Primers *Lehmann et al. (1995)* bzw. des JH-Primers nach *Mc Carthy et al.* und des 5'Dimeres zwischen beiden Primern den Anforderungen an eine hochstringente Primersuche nicht.

3.2.1.2 PCR-Ergebnisse der getesteten FR3-Systeme

Alle mit Hilfe der Testung im *Oligo* ausgewählten Primersysteme wurden an DNA aus polyklonalen Hautbiopsien (in Paraffin eingebettet) und PBMC getestet und in der Agarosegelelektrophorese und im Genescan analysiert.

3.2.1.2.1 Ergebnisse der Konsensusprimer-PCR (s)

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der AGE und des Genescan:

Tab. 18: Ergebnisse der PCR 3.1.-3.4.

PCR	3.1	3.2	3.3	3.4
Agarosebild:				
unspezifische Banden:	von 40-60bp, bei ca. 120bp, 130bp, 210bp, 350bp	von 40-60bp	nein	von 40-50bp, bei ca. 210bp
polyklonaler Schmier:	nein	nein	ja, im Bereich von 100-150bp	ja, im Bereich von 80-120bp
Genescan:				
unspezifische Banden:	ja, konstant bei 30bp, 31bp, 32bp, 85bp	ja, konstant bei 36bp, 40bp	ja, von 40-55bp	ja, von 30-55bp, konstant bei 20bp, 33bp, 44bp, 94bp, 217bp
polyklonales Profil:	nein	einige Peaks erkennbar, aber kein polyklonales Profil	ja	ja
geeignet:	nein	nein	ja	ja

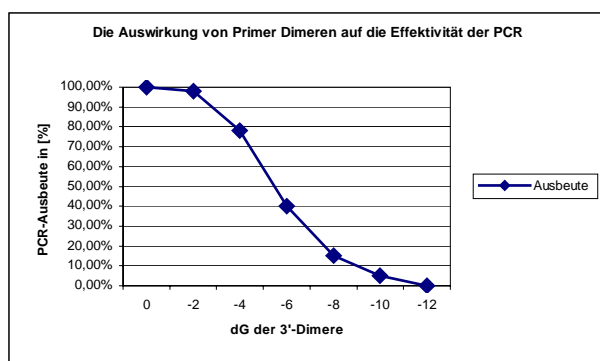


Abb. 4: aus (Rychlik 2000)

Obwohl die Primer der PCR 3.1 und 3.2 unter den Bedingungen „moderate“ bzw. „high“ keine 3' Dimere über -3,5 kcal/mol zeigten, konnte kein spezifisches Produkt amplifiziert werden.

Das in Abbildung 4 dargestellte Diagramm zeigt die theoretische Abhängigkeit der Effizienz der PCR von der Bildung von 3' Dimere. Die Kurve ist nur als ungefähre Richtlinie zu betrachten, da die Effizienz der PCR auch von der Anlagerungstemperatur, der Spezifität der Primer und anderen Parametern abhängt. Ab -3,5 kcal/mol beträgt die Ausbeute nur noch etwa 75%.

Die besondere Bedeutung der 3' Dimmer-Formation erklärt sich daraus, dass diese nicht besonders stabil sein müssen. Nur wenig Zeit wird von der Polymerase benötigt, um das 3' Ende des Dimers zu erkennen und die Polymerisation zu starten. Insofern werden die Dimere sogar bevorzugt verlängert. Aus dieser Situation ergibt sich dann eine Kettenreaktion. Die exlongierten Primer könne wiederum weitere 3' Dimere untereinander oder mit noch unverlängerten Primern bilden, womöglich mit weitaus höherem dG.

Vielleicht wird dieser Mechanismus noch dadurch verstärkt, dass in der PCR 3.1 und 3.2 jeweils fünf verschiedene Primer zum Einsatz kommen. Die verlängerten Primer stehen für die PCR

nicht mehr zur Verfügung. Warum bei der PCR 3.1 gar kein Amplifikat im korrekten Größenbereich entsteht, bleibt unklar.

Die PCR 3.3 und 3.4 zeigten in Elektrophorese und Genescan ein polyklonales Profil. Obwohl der JH-Primer *McCarthy et al.* (1990) ein 3' Dimer mit einem dG von -4,4 kcal/mol und mit dem FR3-Primer *Lehmann et al.* (1995) ein 3' Dimer von -3,5 kcal/mol bildet, entsteht ein polyklonales Amplifikat.

Eine Erklärung hierfür wäre, dass bei dem PCR-System 3.3, im Gegensatz zu PCR 3.1 und 3.2, hier nur zwei statt fünf verschiedene Primer in einem PCR-Ansatz verwendet werden und somit die Möglichkeiten der gegenseitigen Verlängerung von Dimeren geringer sind.

Die PCR 3.4 erfüllte im *Oligo* die Anforderungen für eine hochstringente Primersuche.

Wegen der Vermutung, dass die Fluoreszenzmarkierung beim JH-Primer die Sensitivität der PCR noch mehr senken könnte, wurde die PCR 3.1 auch mit unmarkiertem Primer durchgeführt und mit der TGGE ausgewertet. Es zeigten sich wiederum nur unspezifische Banden im Elektrophoresebild. Auch die Durchführung der PCR 3.1 mit einem Stufen-PCR-System (Storch-Hagenlocher et al. 2000), wie unter Punkt 2.2.2.2 (PCR-Prog. 3) erläutert, brachte keine Verbesserung der Ergebnisse. Stufen-PCR-System bedeutet, dass man die Anlagerungstemperatur während des Ablaufes des PCR-Programmes stufenweise um einige °C erhöht. Es wurden noch weitere Primerkombinationen getestet (Tab. 19).

Auch diese Versuche brachten keine Verbesserung der Effektivität der PCR. Einige Kombinationen zeigten zwar ein polyklonales Ergebnis, doch die Ausbeute des spezifischen Amplifikats, beurteilt nach der Stärke des polyklonalen „Schmiers“ in der AGE bzw. nach der Höhe und Regelmäßigkeit der Peaks im Genescan, war bei keiner deutlich besser als bei der seit langem routinemäßig durchgeführten PCR (PCR 3.4).

Tab. 19: Ergebnisse der Testung weiterer PCR

			JH(GAL99)			JH(ING93)			JH(MCC90)			JH(DEA91)
FR3(BRI90)	B:	E:	- , PD	B:	E:	(+)	B:	E:	(+)	B:	E:	+
		G:	PD , ~									
		T:	- , PD									
	H:	E:	- , PD	H:		n.d.	H:		n.d.	H:		n.d.
		G:	- , PD									
FR3(LEH95)	B:		n.d.	B:		n.d.	B:	E:	+	B:		n.d.
								G:	+			
	H:		n.d.	H:		n.d.	H:	E:	+	H:		n.d.
								G:	+			
FR3(HAY99)	B:	E:	PD , ~	B:	E:	(+) , PD	B:	E:	-	B:		n.d.
		G:	PD , ~									
	H:	E:	- , PD	H:	E:	(+) , PD	H:		n.d.	H:		n.d.
		G:	- , PD									

Legende der Tab 19:

B:	-Blutprobe(PBMC)	PD	-Primerdimere
H:	-Hautprobe(Paraffin)	~	-das polyklonale Profil ist von unspez. Peaks überlagert
E:	-Agarosegelelektrophorese	+	-spezifisches Amplifikat in ausreichender Konzentration vorhanden
G:	-Genescan	(+)	-spezifisches Amplifikat nur in geringer Konzentration vorhanden, -d. h. in der Elektrophorese nur schwach sichtbarer "Schmier"
T:	-TGGE		
n.d.	-nicht durchgeführt	-	-kein Amplifikat

3.2.1.2.2 *Ergebnisse der Konsensusprimer-PCR (sn)*

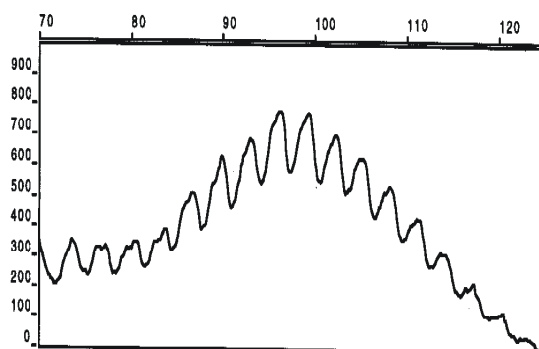
Eine Möglichkeit die Ausbeute der PCR zu erhöhen, und somit trotz Dimerbildung ein spezifisches Amplifikat zu erhalten, ist die Durchführung einer geschachtelten PCR.

Drei verschiedene Primersysteme, wie in Abschnitt 2.2.3. beschrieben, wurden getestet: FR3.5, FR3.6, FR3.7. Das dG der 3'Dimere der verschiedenen Primer untereinander bei der Testung im *Oligo* lag zwischen -3,0 und -5 kcal/mol. Bei allen drei PCR war sowohl bei der Verwendung von PBMC als auch bei der Verwendung von Paraffinschnitten in der AGE ein polyklonaler „Schmier“ erkennbar.

Da das PCR-System 3.7 hauptsächlich für die anschließende Klonierung entwickelt wurde [Primer mit Restriktionssequenz-(Inghirami et al. 1993)], wurden nur die PCR 3.5 und 3.6 mit FAM-markierten Primern durchgeführt. Nach der Genescan-Analyse zeigten beide PCR polyklonale Profile im spezifischen Bereich. Aus zwei wesentlichen Gründen wurde die PCR 3.5. für die Untersuchung der CBCL ausgewählt:

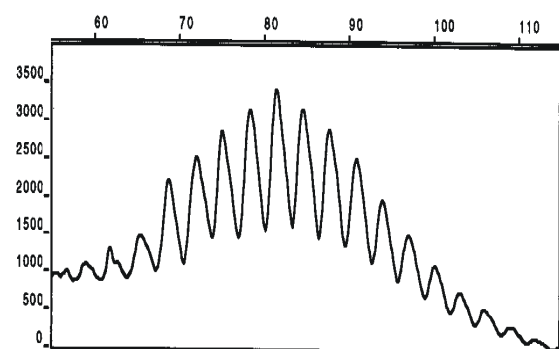
1. Die PCR 3.5 (Brisco et al.) zeigte im Durchschnitt größere Peakhöhen und weniger unspezifische Banden im Bereich von 20-40bp. (Abb. 5)
2. Bei den Profilen der PCR 3.6 (Hayashi et al.) waren die Peaks des Genescan-Profiles etwas unregelmäßiger, teilweise gingen sie fließend ineinander über, so dass eine Interpretation der Profile eventuell erschwert würde. (Abb. 6)

Abb. 5: Genescan-Profile der PCR 3.5 und 3.6 (PBMC)



PCR 3.6 (HAY99)

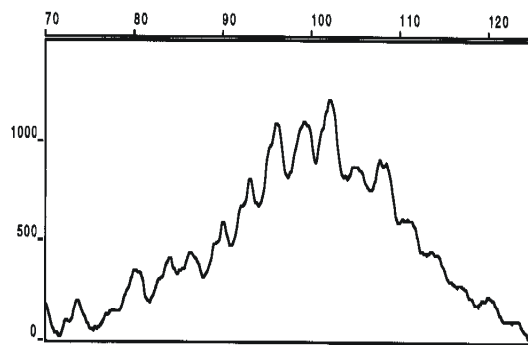
Material: PBMC aus Blut (poly)



PCR: 3.5 (BRI90)

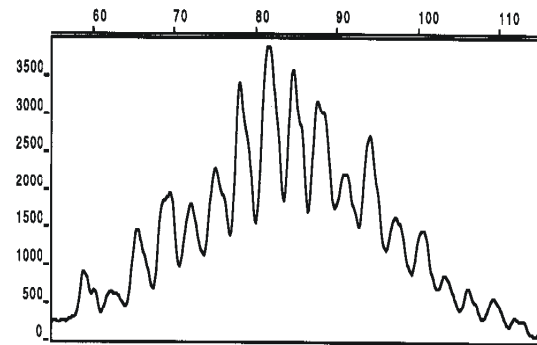
Material: PBMC aus Blut (poly)

Abb. 6: Genescan-Profil der PCR 3.5 und 3.6 (Paraffin)



PCR 3.6 (HAY99)

Material: Haut in Paraffin eingebettet (poly)



PCR: 3.5 (BRI90)

Material: Haut in Paraffin eingebettet (poly)

3.2.2 Die FR1 - PCR im Überblick

Für den FR1-Bereich des VH-Genes sind zwei Primersysteme mit fam-Primern (Marks et al. 1991, Küppers et al. 1994) und ein System mit einem cons-Primer entwickelt worden (Aubin et al. 1995). Die meisten Untersucher verwenden die fam-Primer in einem Multiplex-Ansatz (Lehmann et al. 1995, Aubin et al. 1995), einige jeweils nur einen Primer pro PCR-Ansatz (Deane und Norton 1991, Child et al. 2001). Eine Übersicht über die FR1-Primer gibt die Tabelle 6 im Abschnitt 2.2.4. Ähnlich wie bei der FR3-PCR variiert auch hier die Sensitivität in den Studien zwischen 52%-90% (Deane und Norton 1991, Aubin et al. 1995, Hayashi et al. 1999, Nihal et al. 2000, Child et al. 2001). Dies liegt vermutlich an den verschiedenen PCR-Strategien, zum Teil aber auch an den unterschiedlichen Subtypen von B-Zell Lymphomen bzw. Leukämien, die in der jeweiligen Studie untersucht wurden (Aubin et al. 1995).

Die FR1-PCR-Systeme wurden zunächst mit PBMC und unmarkierten Primern durchgeführt, da diese erfahrungsgemäß spezifische Amplifikate in höherer Menge liefern.

3.2.2.1 Ergebnisse der Überprüfung der FR1-Primer im Oligo

Da die fam-Primer von Küppers et al. (1994) bereits von mehreren anderen Arbeitsgruppen verwandt wurden, wurde die Testung im *Oligo* zunächst mit diesen durchgeführt. Die Tabelle 20 zeigt die Dimerbildung der Primer mit sich selbst, Tabelle 21 die Dimerbildung der Primer untereinander.

Tab. 20: Ergebnisse der Primerprüfung mit *Oligo*

Primer	Sequenz	Das stabilste 3' Dimer in kcal/mol	Das stabilste 5'Dimer gesamt in kcal/mol	Haarnadel	T _m in °C	Interne Stabilität, 3'
FR1.1a(KÜP94)	5' CCT CAG TGA AGG TCT CCT GCA AGG C 3'	-3,3	-6,9	-0,4 kcal/mol, T _m = 32 °C	77	9
FR1.1b(KÜP94)	5' CCT CAG TGA AGG TTT CCT GCA AGG C 3'	-3,1	-6,9	-0,4 kcal/mol, T _m = 32 °C	77	9
FR1.2(KÜP94)	5' GTC CTG CGC TGG TGA AAC CCA CAC A 3'	-1,9	-9,8	-0,7 kcal/mol, T _m = 41 °C	81	7
FR1.3(KÜP94)	5' GGG GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AG 3	-3,5	-6,9	1,50 kcal/mol	80	8,5
FR1.4a(KÜP94)	5' GAC CCT GTC CCT CAC CTG CGC TGT C 3'	-2,9	-9,8	2,30 kcal/mol	81	7,5
FR1.4b(KÜP94)	5' GAC CCT GTC CCT CAC CTG CAC TGT C 3'	-2,9	-6,9	2,30 kcal/mol	77	6
FR1.5a(KÜP94)	5' AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG AGG A 3'	-1,6	-16	Keine	79	8
FR1.5b(KÜP94)	5' AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG AAG A 3'	-3,2	-16	1,30 kcal/mol	77	7
FR1.6(KÜP94)	5' ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G 3'	-1,9	-9,8	0,4 kcal/mol, T _m = 18 °C	81	6,5

Tab. 21: Ergebnisse der Multiplex-Testung FR1(KÜP)/JH(GAL)

Primer:	Moderate*	TM in °C
FR1.1a(KÜP94)	-3,1M	77
FR1.1b(KÜP94)	-3,1M	77
FR1.2(KÜP94)	-3,1M	81,4
FR1.3(KÜP94)	-8,5M	79,6
FR1.4a(KÜP94)	-6,6M	81,2
FR1.4b(KÜP94)	-9,8M	77,3
FR1.5a(KÜP94)	-6,3M	78,8
FR1.5b(KÜP94)	-6,2M	77,1
FR1.6(KÜP94)	-9,6M	81,3
JH(GAL99)	-6,0M	66,8

*dG der 3'-Dimere bis -10,0 kcal/mol

Trotz der hohen dG-Werte in der Multiplextestung wurde zunächst eine Multiplex-PCR, das heißt alle sechs FR1-Primer in einem PCR-Ansatz, durchgeführt (siehe 2.2.4, PCR 1.1).

3.2.2.2 PCR-Ergebnisse der getesteten FR1-Systeme

In der AGE waren nur unspezifische Banden im Bereich von 20-200 bp erkennbar. Im korrekten Bereich von 270-350 bp waren keine Banden sichtbar.

Vermutlich ist durch die vielen 3' Dimere mit relativ hohem dG-Betrag die Bildung eines spezifischen Amplifikates nicht möglich.

Um die Möglichkeiten der Dimerbildungen zu reduzieren, wurde die PCR mit jeweils nur einem fam-Primer und einem JH-Primer durchgeführt. Da die meisten VH-Gene den Familien eins und drei angehören, wurden zunächst die fam-Primer für VH1 und VH3 verwendet.

Da sich bei 57 °C Anlagerungstemperatur gleichfalls kein Amplifikat in der AGE zeigte, wurde die Temperatur schrittweise erniedrigt. Erst bei 52°C Anlagerungstemperatur war Amplifikat im korrekten Größenbereich von 270-340bp in der AGE erkennbar. In der TGGE erwies sich das Amplifikat als ein Unspezifisches: Es zeigte sich kein polyklonaler „Schmier“, sondern eine Folge aus mehreren, scharf begrenzten Banden (sog. „Leitern“).

Es wurden weitere PCR-Ansätze mit unterschiedlichen, in der Literatur beschriebenen, Primerkombinationen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 22 dargestellt:

Tab. 22: Getestete Primerkombinationen der FR1-PCR

FR1-Primer				JH-Primer (single PCR)								nested:	LJH(BR190)		LJH(HAY99)				
				JH(GAL99)		JH(DEA91)		JH(MCC90)		VLJH(BR190)			VLJH(BR190)		VLJH(HAY99)				
FR1multiplex(KÜP94)		B	E	- ; PD	B	E	- ; PD	B	E	-;PD	B		E	- ; PD	B	E	- ; PD		
FR1einzeln(KÜP94)		B	E	PD ; ~	B	E	-	B	E	-	B		E	-			n.d.		
FR1.1-7(MAR91)		B	T	~			n.d.			n.d.				n.d.		B	E	- ; PD	
FR1cons(AUB95)				n.d.			n.d.			n.d.			n.d.	B	T	~, PD	B	E	~, PD
B:	-Blutprobe(PBMC)				PD	-Primerdimere													
H:	-Hautprobe(Paraffin)				~	-das polyklonale Profil ist von unspez. Peaks überlagert													
E:	-Agarosegelelektrophorese				+	-spezifisches Amplifikat in ausreichender Konzentration vorhanden													
G:	-Genescan				(+)	-spezifisches Amplifikat nur in geringer Konzentration vorhanden,													
T:	-TGGE					-d. h. in der Elektrophorese nur schwach sichtbarer "Schmier"													
n.d.	-nicht durchgeführt				-	-kein Amplifikat													

Keine der getesteten PCR zeigte ein zufriedenstellendes Ergebnis.

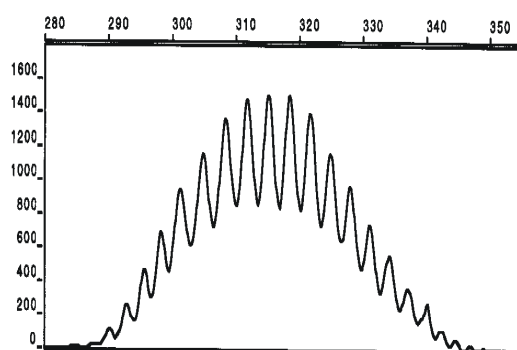
3.2.2.3 Entwicklung des neuen Primersystems

Eine Möglichkeit, sehr sensitiv einen Genabschnitt zu amplifizieren, ist, eine PCR durchzuführen, die sowohl im VH-Genabschnitt, als auch im JH-Genabschnitt geschachtelt ist. Primer, die in den verschiedenen FR1-PCR bereits verwendet wurden, wurden neu kombiniert (siehe 2.2.4, PCR1.2).

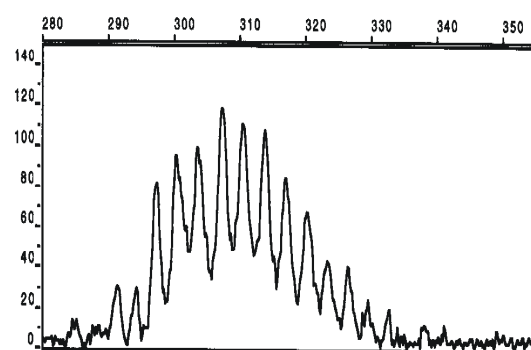
Vor der Durchführung dieser PCR wurden auch diese Primer im *Oligo* getestet. Die dG-Werte der 3' Dimere waren im Bereich von -2 bis -11 kcal/mol und überschritten somit zum Teil weit die vorgegebene Grenze von -3,5 kcal/mol. Trotz dieser schlechten Testwerte, war in der AGE ein Amplifikat im korrekten Bereich von 270-340 bp erkennbar.

Bei der Durchführung der PCR mit dem FAM-markierten Primer VLJH nach *Brisco et al.* (1990) zeigte sich im Genescan ein polyklonales Profil (Abb. 7). Diese PCR wurde für die Untersuchung der CBCL eingesetzt.

Abb. 7: Genescan-Profile der PCR 1.2



PCR 1.2 (n),
Material: Blut aus PBMC (poly)



PCR 1.2 (n),
Material: Haut in Paraffin eingebettet (poly)

3.2.3 Die Leader - PCR

Eine weitere Möglichkeit das VDJ-Rearrangement zu amplifizieren ist die Verwendung von Primern die an die Leader-Region des VH-Gens binden. *Child et al.* (2001) konnten mit diesem PCR-Ansatz in 74% ein klonales Amplifikat bei primär kutanen B-Zell Lymphomen nachweisen.

Die bisher veröffentlichten Primer sind in Tab. 8 zusammengefasst.

3.2.3.1 Ergebnisse der Überprüfung der Leader-Primer im Oligo

Auch die Primer der Leader-Region des VDJ-Rearrangements wurden zunächst einzeln (Tab. 23) und dann im Multiplex-Programm des *Oligo* getestet (Tab. 24).

Tab. 23: Ergebnisse der Primerprüfung

Primer	Das stabilste 3' Dimer in kcal/mol	Das stabilste 5' Dimer gesamt in kcal/mol	Haarnadel	Tm in °C	Int. Stab., 3'
Inghirami et al.1993					
VH1	-4,7	-5,3	keine	69.3	8.2
VH2	-1,6	-4,7	-0,4 kcal/mol, Tm = 34 °C	59.5	8.2
VH3	-4,7	-5,3	1.40 kcal/mol	67.9	8.2
VH4	-1,9	-4,4	0.80 kcal/mol, Tm = 4 °C	58.6	7.0
VH5	keine	-5	-0.80 kcal/mol, Tm = 45 °C	74.0	7.8
VH6	-3,4	-3,4	2.20 kcal/mol	57.2	7.9

Tab. 24: Ergebnisse der Multiplex-Testung

Primer	Moderate	TM in C
Inghirami et al. 1993		
VH1	-6.6 M	69.3
VH2	-4.7 M	53.9
VH3	-6.6 M	67.9
VH4	-5.0 M	58.6
VH5	- M	74.0
VH6	-3.4 M	57.2
JH	-6.3 M	72.2

dG der 3' Dimere <-6.7kcal/mol

Die hohen dG-Werte zeigen an, dass eine Multiplex-PCR mit allen sechs Leader-Primern theoretisch nicht möglich ist.

Mit einer geschachtelten PCR mit allen sechs LEA-Primern und den LJH/VLJH-Primer nach *Brisco et al.* (1990) konnte kein Amplifikat erzeugt werden.

Deshalb wurde eine ungeschachtelte PCR mit jeweils einem Leader-Primer pro Ansatz durchgeführt. Primer und PCR-Programm wurden der Arbeit von *Child et al.* (2001) entnommen (siehe 2.2.5).

3.2.3.2 PCR-Ergebnisse des Leader-Systems

Mit dem Leader PCR-System werden vergleichsweise große Amplifikate, d.h. mit einer Länge von ca. 500bp gebildet. Es wurden zuerst unmarkierte Primer verwendet. Die Auswertung der PCR erfolgte deshalb mit der TGGE.

3.2.3.2.1 Testung mit DNA aus PBMC (polyklonal)

Die spezifischen Amplifikate, das heißt Amplifikate im richtigen Größenbereich, die sich als „Schmier“ in der TGGE darstellen, sind, wenn vorhanden, nur sehr schwach und häufig nur mit den Leader-Primern VH1 und VH3 vorhanden. Offensichtlich reicht die Anzahl entsprechend langer DNA-Moleküle nicht aus, um eine erfolgreiche Amplifikation zu ermöglichen. Das würde erklären, warum die PCR mit dem VH1- und dem VH3-Primer funktioniert. VH1- und VH3-Gene bilden die beiden größten VH-Familien. Somit ist auch die Menge an DNA-Matrize dieser Familien in der Probe relativ am größten.

3.2.3.2.2 Testung mit Paraffinproben der CBCL

Es wurden DNA-Proben von in Paraffin eingebetteten Hautproben zehn ausgewählter CBCL-Patienten mit der Leader-PCR getestet. Bei keiner Probe konnte spezifisches Produkt amplifiziert werden.

3.2.3.2.3 Testung mit Kryoproben der CBCL

Die Leader-PCR erfolgte auch mit Kryoproben von CBCL-Patienten: In Kryoproben ist die DNA besser erhalten als in Paraffinproben (Hoeve et al. 2000).

Tab. 25: Ergebnisse der Leader-PCR

Name	Erg.Rout.	Leader 1	Leader 2	Leader 3	Leader 4	Leader 5	Leader 6
P.A.	poly	k.A.	k.A.	poly	k.A.	k.A.	k.A.
W.J.	mono	k.A.	k.A.	poly	mono	n.a.	k.A.
H.G. (1)	mono	poly	k.A.	poly	mono	n.a.	k.A.
S.P.(1)	mono	poly	n.d.	poly	n.d.	n.d.	n.d.
K.W.(2)	mono	poly	k.A.	mono	poly	(poly)	k.A.

Wie aus der Tabelle 25 ersichtlich, konnte in den kleineren VH-Familien oft kein Produkt amplifiziert werden. Dennoch sind 3 von 5 untersuchten Proben klonal.: einmal in der Familie VH3 und zweimal in der Familie VH4.

Ob es sich bei den diskreten Banden in der TGGE wirklich um Monoklonalität oder um einen sogenannten „sampling error“ (s. 3.4.2) handelt, lässt sich aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Proben schwer sagen. Auffällig ist, dass zwei der fünf untersuchten Proben in VH4 monoklonal sind, obwohl VH4 mit sechs funktionalen VH-Genen nur die drittgrößte Familie ist. Da für die Untersuchung der CBCL hauptsächlich Paraffinproben zur Verfügung standen, wurde die Leader-PCR für die Diagnostik nicht verwandt.

3.2.4 Die FR2 - PCR im Überblick

Eine Übersicht über die FR2-Primer gibt die Tabelle 10 im Abschnitt 2.2.6.

Die Sensitivität der FR2-PCR-Systeme liegt bei der Untersuchung von NHL im Bereich von 42%-85% (Diss et al. 1993, Kitamura et al. 1996, Gong et al. 1999). Für die CBCL liegen keine Daten vor. Eine Testung der Primer im *Oligo* ist bei diesen stark degenerierten FR2-Primern

nicht möglich, da das *Oligo*-Programm die degenerierten Basen nicht erkennt.

Wie bereits bei der FR3-PCR wurden zuerst die ungeschachtelten und dann die geschachtelten PCR getestet.

Die Durchführung der ungeschachtelten PCR erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von *Galimberti et al.* (1999) (PCR 2.1). Die Primer für die geschachtelte PCR wurden der Arbeit von *Diss et al.* (1993) (PCR 2.2) und *Kitamura et al.* (1996) (PCR 2.3) entnommen.

3.2.4.1 PCR-Ergebnisse der FR2-Systeme

Eine Übersicht gibt Tabelle 26:

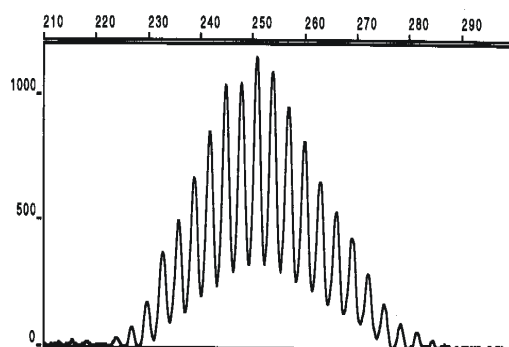
Tab. 26: Ergebnisse der PCR 2.1.-2.3.

PCR	2.1	2.2	2.3
AGE			
unspezifische Banden:	von 30-50bp viele Nebenbanden	von 150-200bp viele Nebenbanden	wenige im Bereich von 30-50bp
Amplifikat im korrekten Bereich:	nein	ja	ja, im Bereich von 220-280bp
TGGE			
polyklonaler Schmier:	nicht durchgeführt	nein, „Leitern“ unspezifischer Banden	nicht durchgeführt
Genescan			
polyklonales Profil:	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	ja
geeignet:	nein	nein	ja

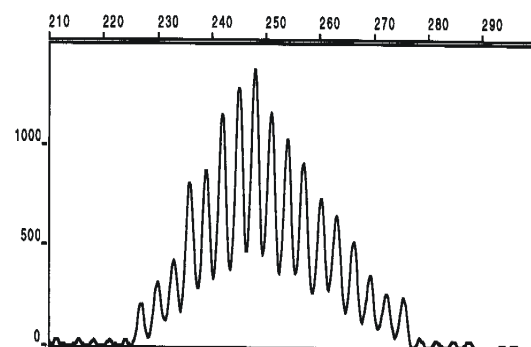
Bei der PCR FR2.1 wurde die Anlagerungs-Temperatur schrittweise bis auf 52°C erniedrigt. Bei 52°C zeigten sich Banden im Bereich von 200-240bp, die sich aber auf der TGGE als unspezifisch herausstellten.

Die PCR FR2.3 wurde für die Untersuchung der CBCL ausgewählt. (Abb. 8)

Abb. 8: Genescan-Profile der PCR 2.3



PCR 2.3 (n)
Material: PBMC aus Blut (poly)



PCR 2.3 (n)
Material: Haut in Paraffin eingebettet (poly)

3.2.5 **Die IgL - PCR**

Wenn man verschiedene Primer-Sets verwendet, um das IgH-Rearrangement zu amplifizieren, bleiben, unabhängig von der Lymphomart, immer noch mindestens 20% der klonalen Rearrangements unerkannt (Gong et al. 1999, Child et al. 2001).

Um noch mehr Lymphome zu erfassen, haben einige Untersucher spezifische Primer entwickelt, die entweder die Leader- oder die FR1-Region des Ig-Leichtkettengens erkennen (Hawkins et al. 1994, Hoogeveen et al. 1998).

Viele dieser Studien basierten nur auf einer kleinen Anzahl von Fällen, da die Amplifikation des Ig-Leichtkettengens viele verschiedene familienspezifische Primerpaare benötigt. Außerdem sind die Amplifikate groß (ca. 350bp) und somit ist die PCR mit Paraffinproben oft nicht erfolgreich (Küppers et al. 1995, Gong et al. 1999).

Gong et al., (1999) entwickelten cons-Primer für die FR3 κ -Region und die J κ -Region zur Amplifikation der CDR3-Region des Ig κ -Gens. Studien zeigten, dass die Amplifikation der κ -Kette für den Nachweis der Klonalität ausreicht, da ca. 80% der klonalen B-Zellen, die λ -Ketten exprimieren, auch einen rearrangierten Ig κ -Lokus besitzen, und somit ein Nachweis der Klonalität mit dem Primerset für die CDR3-Region des Ig κ -Gens möglich ist (Gong et al. 1999).

In 52% konnten *Gong et al.*, mit dieser PCR-Methode ein klonales Rearrangement nachweisen.

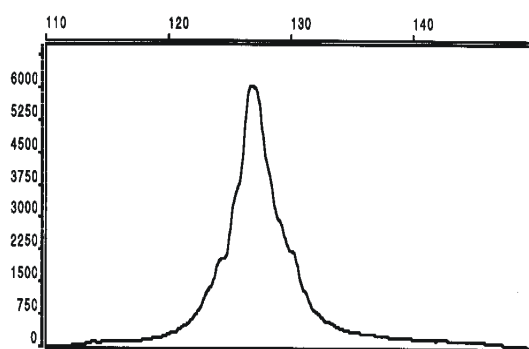
Da die Variabilität der Länge der CDR3-Region des κ -Gens sehr klein ist (Produktlängen von 126-144bp) ist die Auswertung mit Elektrophoresemethoden zu empfehlen, die sowohl nach der Länge als auch nach der Sequenz auftrennen (Shiokawa et al. 1998, Gong et al. 1999).

Es wurde die IgL-PCR nach *Gong et al.* (1999) durchgeführt und die Produkte mittels TGGE und Genescan ausgewertet (siehe Abschnitt 2.2.7).

3.2.5.1 PCR-Ergebnisse der IgL-PCR

Die PCR nach *Gong et al.* wurde mit DNA-Proben aus polyklonalen PBMC durchgeführt.

Abb. 9: Genescan-Profile der IgL-PCR



Material: PBMC

Im Genescan zeigte sich bei allen untersuchten PBMC-Proben ein konstanter Peak mit einer Basenpaarlänge von 120-135bp. Der Peak hat sein Maximum bei 127 bp. (siehe Abb. 9)

In der TGGE ergab sich folgendes Bild:

Bei ca. 125-130 bp zeigte sich nur eine sehr diskrete Bande, die nach unten und oben scharf begrenzt ist.

Da es sich bei den untersuchten Proben um polyklonale B-Zell Populationen handeln sollte, müsste sich im TGGE-Bild eine polyklonale „Wolke“ abbilden. Aufgrund des konstanten Peaks im Genescan und der scharfen Begrenzung der Bande in der TGGE wurde das Amplifikat der IgL-PCR als unspezifisch interpretiert.

3.3 Nachweisgrenze

Um für die zwei PCR (PCR 3.5; PCR 1.2) eine untere Nachweisgrenze zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, indem unterschiedliche Mengen extrahierter DNA von der monoklonalen Zelllinie JY mit extrahierter DNA von PBMC zusammen amplifiziert wurden. Die Menge an DNA pro Ansatz betrug jeweils 500 ng. Die Verdünnungsstufen (V1-V6) waren 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5% und 0,1%.

Verdünnungsschema: (Konzentration bei beiden DNAs: 100ng/μl)

- V1(10%) 72μl PBMC + 8μl JY
- V2(5%) 30μl PBMC + 30μl V1
- V3(2,5%) 20μl PBMC + 20μl V2
- V4(1%) 63μl PBMC + 7μl V1
- V5(0,5%) 20μl PBMC + 20μl V4
- V6(0,1%) 45μl PBMC + 5μl V4

Ca. 30% der in den PBMC enthaltenen Zellen sind B-Lymphozyten. Nur diese Zellen haben ein rearrangiertes IgH-Gen und bilden ein Amplifikat bei der Durchführung einer IgH-PCR. Für die tatsächliche Menge an DNA / Zellen ist demzufolge mit dem Faktor 3 zu korrigieren.

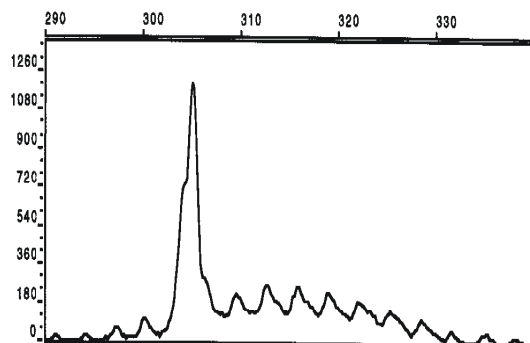
Bei der FR1-PCR(n) war ein klonaler Peak bis zu einer Verdünnungsstufe von 0,5% nachweisbar (Abb. 10). Unter Beachtung des Korrekturfaktors entspräche dies einer Nachweisgrenze von ca. 1,5%. Bis zu einer Verdünnungsstufe von 2,5% war ein klonaler Peak bei der FR3-PCR(sn) sicher detektierbar. Bei 1% und 0,5 % klonaler DNA betrug die Ratio des klonalen Peaks nur noch 1,8 (Abb. 11). Dieses Ergebnis ist als unsicher monoklonal einzustufen. Unter Beachtung des Korrekturfaktors, beträgt also die untere Nachweisgrenze der geschachtelten FR3-PCR sicher 7,5%, grenzwertig ist ein Nachweis bis 1,5% möglich.

Für die Praxis sind eher die unkorrigierten Werte relevant, da sich in der Hautbiopsie neben den B-Zellen auch andere Zellen befinden.

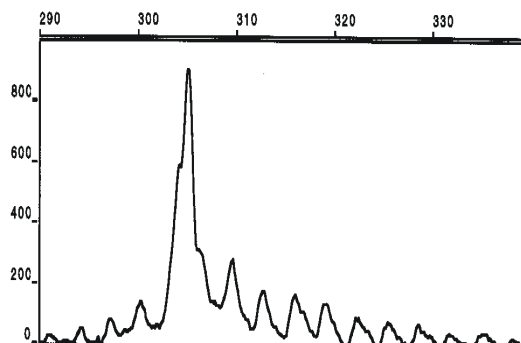
Die niedrigere Nachweisgrenze der FR1-PCR könnte beim Vergleich der beiden PCR-Assays eine höhere Sensitivität der FR1-PCR zufolge haben.

Auf eine Untersuchung der unteren Nachweisgrenze der FR2-PCR wurde verzichtet, da sie für die Routinediagnostik aufgrund der hohen Pseudoklonalität nicht empfohlen werden kann (siehe Abschnitt 3.4.2).

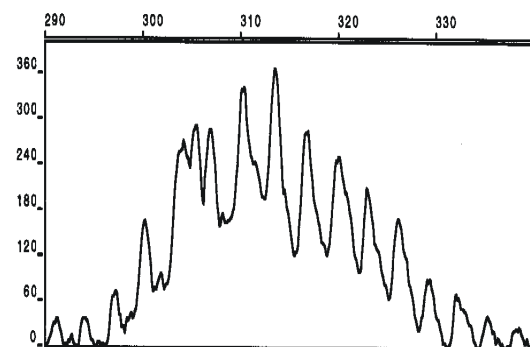
Abb. 10: Verdünnungsreihe der FR1.2(n)-PCR



a: Anteil der JY-DNA: 1% (Ratio 11)

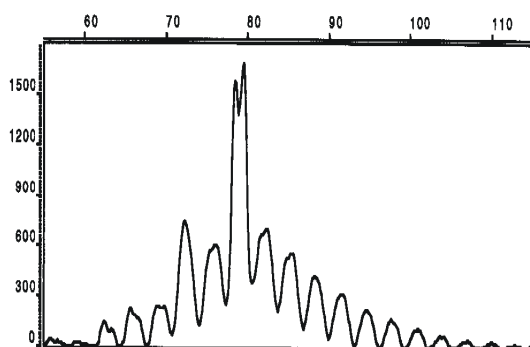


b: Anteil der JY-DNA: 0,5% (Ratio 10)

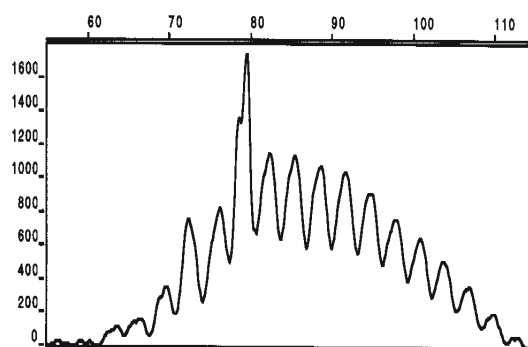


c: Anteil der JY-DNA: 0,1% (polyklonal)

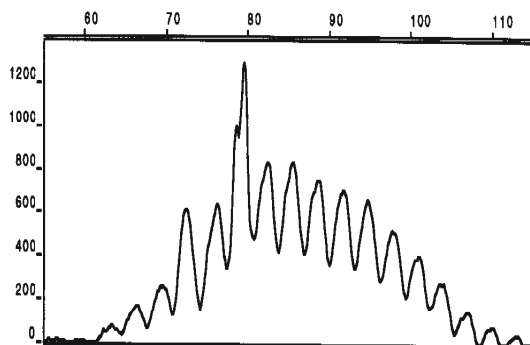
Abb. 11: Verdünnungsreihe der FR3.5(sn)-PCR



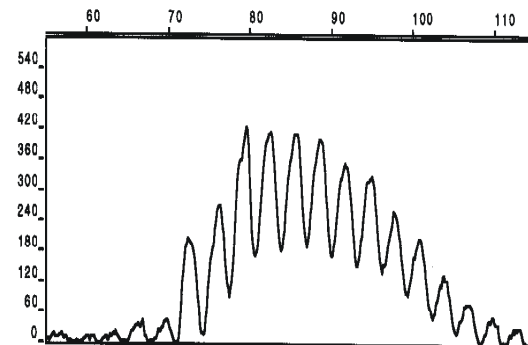
a: Anteil der JY-DNA: 2,5% (Ratio 2,6)



b: Anteil der JY-DNA: 1% (Ratio 1,8)



c: Anteil der JY-DNA: 0,5% (Ratio 1,8)



d: Anteil der JY-DNA: 0,1% (polyklonal)

3.4 Analyse der CBCL-Fälle (Gruppe 1)

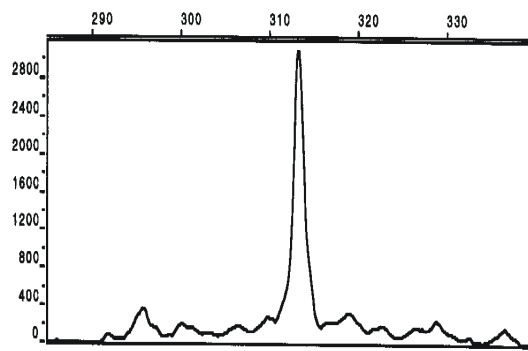
Zur Gegenüberstellung von Klinik bzw. Histologie und Molekularbiologie wurden die Patienten wie unter Abschnitt 2.1.1 beschrieben in zwei Gruppen eingeteilt, d.h. es wurden 51 Patienten der Gruppe 1 und 22 Patienten der Gruppe 2 zugeordnet. Folgende PCR kamen zum Einsatz:

1. PCR: FR3-cons 3.4(s), 2. PCR: FR1-multiplex 1.2(n), 3. PCR: FR2-cons 2.3(n), 4. PCR: FR3-cons 3.5(sn), für eine kleine Patientengruppe die PCR FR3-cons 3.3(s).

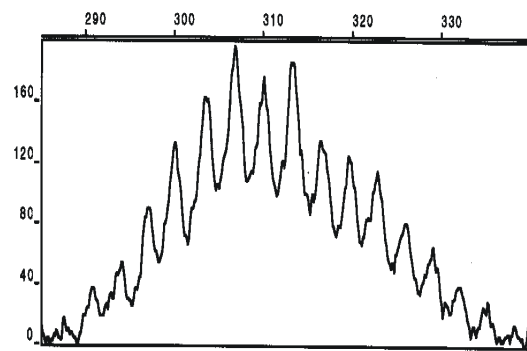
Die Abb. 12 zeigt für jede PCR jeweils ein Beispiel für ein monoklonales und ein polyklonales Ergebnis:

Abb. 12: Darstellung der Genescan-Profile für die angewandten PCR (Proben Nr. s. Tab. 27)

1. FR1-PCR:

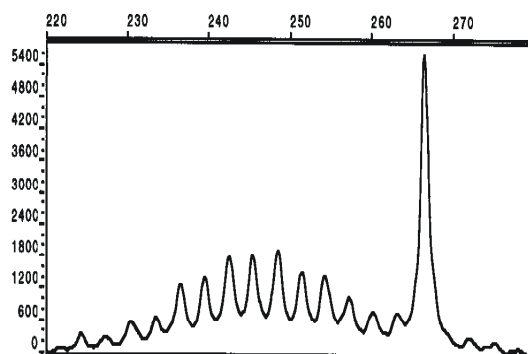


a) 1137/01 (Ratio 12,7)

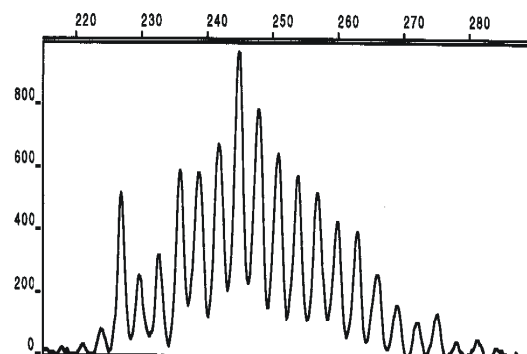


b) 249/01 (polyklonal)

2. FR2-PCR:

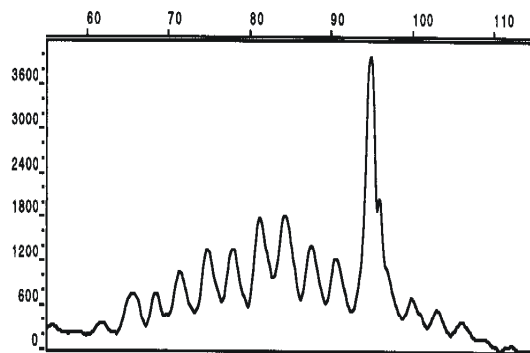


a) 8074 (Ratio 10,7)

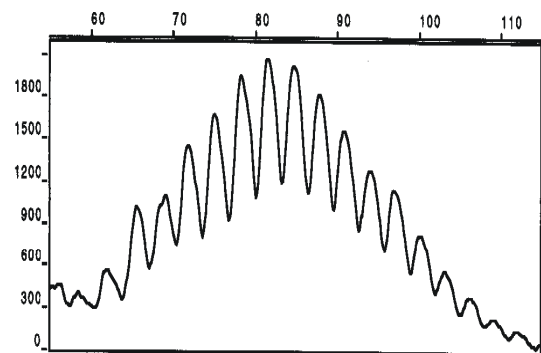


b) 1155/01 (polyklonal)

3. FR3(sn):

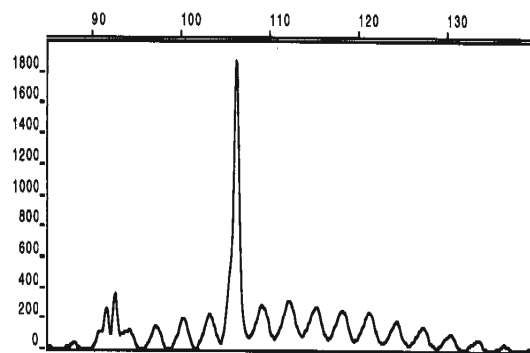


a) 5865 (Ratio 4,0)

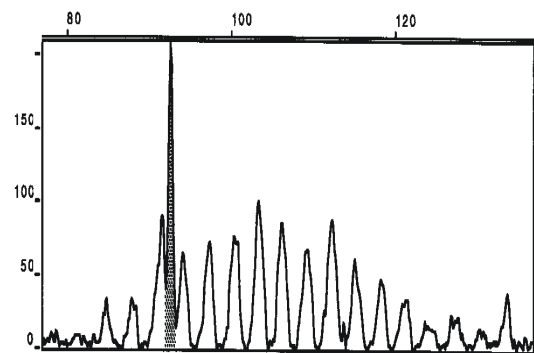


b) 1155/01 (polyklonal)

4. FR3(s):



a) 18/26K (Ratio 7,2)



b) 821/01 (polyklonal; konstanter Peak bei 92bp)

Eine Auflistung sämtlicher Ergebnisse enthält Tabelle 27:

Tab. 27: PCR-Ergebnisse der untersuchten CBCL-Proben (Gruppe1)

Patient	Proben Nr.	Art	FR1(n)	FR2(n)	FR3(sn)	FR3(s)
H.G.(1)	822/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	m	p	m	m
	18/46(K)		m	p	p	m
	1038/01		k.A.	k.A.	p	p
S.M.(2)	501/00	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	m	p	m	m
	926/01		m	p	m	m
C.R.	768/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	k.A.	p	p	p
H.H.	1149/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	p	p	p	p
H.D.	443/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	k.A.	p	p	p
K.W.(1)	020/00	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	m	(m)	p	p
K.R.	1008/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	p	p	p	p
K.N.	170/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	p	p	p	p
K.W.(2)	843/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	X	p	p	p
	18/58(K)		m	m	m	m
K.L.	221/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	(m)	m	m	k.A.
M.R.	1255/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	p	p	m	m
O.B.	249/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	p	p	p	p
P.A.	541/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	k.A.	(m)	p	p
	880/01		p	k.A.	p	p
	18/56(K)		p	p	p	p
S.P.(1)	18/26(K)	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	m	p	(m)	m
S.M.(1)	140/00	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	k.A.	k.A.	p	k.A.
	1052/01		m	p	p	p
S.J.	6251	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	k.A.	k.A.	p	p
W.G.	1329/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	k.A.	p	p	p
W.L.	180/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	p	p	p	p
W.W.	7355	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	m	ol	p	p

Z.W.	393/01	Follikel-Zentrumszell-Lymphom	m	p	m	m
A.M.	1137/00 821/01	Immunozytom(IC)/ Marginalzonenlymphom(MZL)	m m	m m	p p	p p
C.K.	1151/01	IC/MZL	k.A.	ol	m	k.A.
H.G.(2)	1218/01	IC/MZL	m	m	m	m
M.D.	1155/01	IC/MZL	k.A.	p	p	p
F.D.	455/01	IC/MZL oder Plasmazytom	ol	ol	p	k.A.
B.M.	7619	unklassifiziertes CBCL	ol	X	m	p
B.E.	468/01	unklassifiziertes CBCL	k.A.	k.A.	(m)	m
B.L.	6656	unklassifiziertes CBCL	m	X	(m)	p
B.I.	8168	unklassifiziertes CBCL	m	X	ol	p
D.R.	7587	unklassifiziertes CBCL	X	X	ol	p
E.E.	229/00	unklassifiziertes CBCL	k.A.	X	p	p
G.G.	5542	unklassifiziertes CBCL	k.A.	m	m	m
H.C.	7955	unklassifiziertes CBCL	ol	ol	ol	p
H.G.	8624	unklassifiziertes CBCL	m	X	X	m
K.U.	7464	unklassifiziertes CBCL	k.A.	p	p	p
L.A.	5865 8074	unklassifiziertes CBCL	m p	p m	m p	m p
M.W.	564/01	unklassifiziertes CBCL	k.A.	p	p	p
M.G.	766/01	unklassifiziertes CBCL	k.A.	m	p	p
P.L.	783/01	unklassifiziertes CBCL	(m)	k.A.	ol	k.A.
Q.E.	5136	unklassifiziertes CBCL	k.A.	k.A.	p	p
R.R.	573/01	unklassifiziertes CBCL	p	p	p	p
S.H.(1)	991/00	unklassifiziertes CBCL	p	p	p	p
S.H.(2)	7068	unklassifiziertes CBCL	k.A.	m	m	p
S.C.	5334	unklassifiziertes CBCL	X	X	ol	p
S.P.(2)	179/01	unklassifiziertes CBCL	p	p	p	p
S.T.	82/01	unklassifiziertes CBCL	k.A.	X	X	k.A.
S.E.	7426	unklassifiziertes CBCL	m	m	m	m
U.L.	434/01 199/01 845/01	unklassifiziertes CBCL	p m m	p p p	p m p	p m p
W.K.	7343	unklassifiziertes CBCL	p	X	p	p
K.G.	1128/01	CBCL der unteren Extremität	m	ol	m	m
W.J.	893/01 18/51(K)/LK	CBCL der unteren Extremität	k.A. (m)	X (m)	p p	m m

Legende:

p: polyklonal	k.A.: kein Amplifikat	X: Pseudoklonal
m: monoklonal	(m): unsicher monoklonal	ol: (pseudo)oligoklonal
LK : Lymphknoten		

Insgesamt konnte bei der FR1-PCR in 35%, bei der FR2-PCR in 16% und bei der FR3-PCR(sn) in 29% der untersuchten Patienten ein monoklonales Amplifikat nachgewiesen werden. Bei der FR3-PCR(s) waren 27% der untersuchten Patienten monoklonal. Unter Berücksichtigung aller vier verschiedenen PCR lag die diagnostische Sensitivität bei 53%.

Bezogen auf die Proben (n=63) lag die Gesamtsensitivität nur bei 51%. Diese Differenz ergibt sich daraus, dass bei einigen Patienten, mehrere Hautproben zur Verfügung standen. Die Basenpaarlänge des klonalen Rearrangements stimmte in den verschiedenen Proben eines Patienten immer überein.

Bei fünf der neun Patienten, bei denen mehrere Hautbiopsien zur Verfügung standen, konnte allerdings nicht in allen untersuchten Hautproben ein Klon nachgewiesen werden.

Die untersuchten Proben waren nicht immer in allen vier PCR monoklonal. Zum Beispiel konnte bei der Testung der Proben in 12 Fällen nur mit einer der vier durchgeführten PCR ein monoklonales PCR-Produkt nachgewiesen werden. Neunmal war ein monoklonales Ergebnis in

zwei der vier PCR vorhanden, achtmal in drei der vier und dreimal in allen vier PCR.

Die Proben, die nur in einer PCR monoklonal waren, verteilten sich wie folgt auf die verschiedenen PCR:

Tab. 28: Anzahl der Proben, die nur in einer PCR monoklonal waren

PCR	FR1	FR2	FR3sn	FR3s	Summe
Anzahl der Proben	8	2	0	2	12

Bei einigen Patienten war es nicht möglich mit den vorhandenen Proben ein Amplifikat zu erhalten: Die FR1-PCR zeigte in 30% der Patienten kein Amplifikat, die FR2-PCR in 4% und mit der FR3-PCR(s) war bei 10% der Patienten kein Produkt amplifizierbar. Mit der FR3-PCR(sn) konnte bei allen untersuchten Proben ein spezifisches Amplifikat nachgewiesen werden. Wenn die Patienten, bei deren Proben kein Amplifikat produziert werden konnte, unberücksichtigt bleiben, so ergeben sich für die Berechnung der Sensitivität folgende Prozentzahlen: FR1–47%, FR2–16%, FR3(sn)–29%, FR3(s)–30%. Die Sensitivität beträgt dann insgesamt 60%.

3.4.1 Nicht eindeutige Ergebnisse

Einige untersuchte Proben zeigten zwar einen reproduzierbaren klonalen Peak, doch erfüllten die Kriterien für die Monoklonalität aus folgenden Gründen nicht:

1. Fehlende

Reproduzierbarkeit: Die Probe war bei der ersten Untersuchung monoklonal, bei der Wiederholung die DNA nicht mehr amplifizierbar.

2. Peak-Ratio $\leq 2,0$: Die Probe ist als unsicher mono zu bewerten, da die Ratio des monoklonalen Peaks bei einem oder beiden PCR-Ansätzen im Bereich von 1,8-2,0 liegt (siehe Abb. 13).

3. Profil degeneriert: Es ist ein reproduzierbarer monoklonaler Peak nachweisbar, doch das Hintergrundprofil ist unregelmäßig: Peaks fehlen oder dominieren.

4. Peak nicht in

Frame: Der Abstand des monoklonalen Peaks zu seinen benachbarten Peaks ist nicht drei Basenpaare.

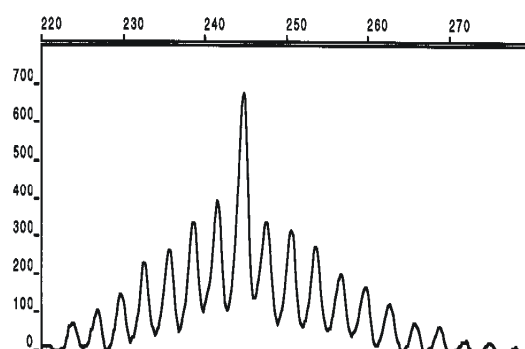
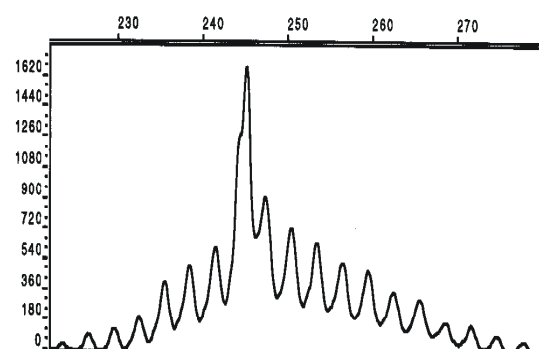
Eine Übersicht gibt die Tabelle 29:

Tab. 29: Zusammenfassung der nicht eindeutigen Ergebnisse

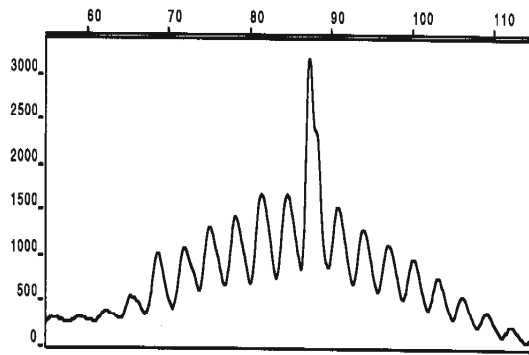
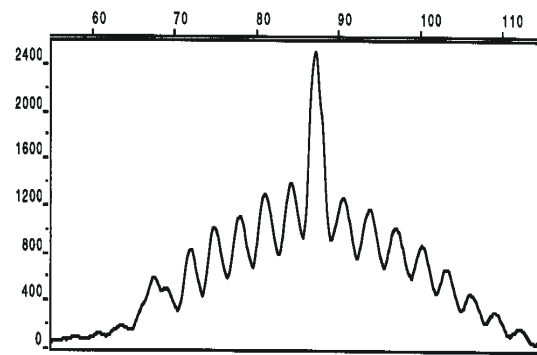
R-Nr.	Lymphomart				Bemerkungen:
FR1		Erg.	Peak	Peak-Ratio	
221/01	FCCL	mono!	310	7584*.	FR1-PCR n. repr.
		k.A.			(PCR: FR2, FR3(sn) mono; FR3(s) k.A.)
		k.A.			
783/01	unklassif. CBCL	mono!	290	3164*	FR1-PCR n.repr.
		k.A.			(PCR: FR3(sn) oligo; FR2, FR3(s) k.A.)
		k.A.			
18/51K	CBCL der unt. Extr. Lymphknoten	mono	305	*	FR1-PCR n.repr.
		k.A.			(PCR: FR2 unsicher mono; FR3(sn) poly; FR3(s) mono)
FR2		Erg.	Peak	Peak-Ratio	
20/00	FCCL	mono	294	7,6	FR2-PCR: Peak Ratio≤2
		mono	258	1,8	(PCR: FR1 mono; FR3(sn) poly; FR3(s) k.A.)
541/01	FCCL	mono	245	1,8	FR2-PCR: Peak Ratio≤2
		mono	245	2,2	(PCR: FR1 k.A.; FR3(sn); FR3(s) poly)
18/51K	CBCL der unt. Extr. Lymphknoten	mono	245	2,2	FR2-PCR: Profil degeneriert
		mono	246	2,8	(PCR: FR1 unsicher mono; FR3(sn) poly; FR3(s) mono)
FR3(sn)		Erg.	Peak	Peak-Ratio	
6656	unklassif. CBCL	mono	69	5,9	FR3(sn)-PCR: Peak nicht in Frame
		mono	70	5,1	(PCR: FR1 mono; FR2 Pseudo; FR3(s) k.A.)
		mono	70	6	
468/01	unklassif. CBCL	mono	78	1,9	FR3(sn)-PCR: Peak Ratio≤2
		mono	78	1,9	(PCR: FR1, FR2 k.A.; FR3(s) mono)
18/26K	FCCL	mono	87	2	FR3(sn)-PCR: Peak Ratio≤2
		mono	87	1,9	(PCR: FR1, FR3(s) mono; FR2 poly)

*Höhe des Peaks im Genescan: aufgrund des fehlenden Hintergrundprofils ist eine Peakberechnung n. mgl.
in Klammern: Ergebnisse der anderen durchgeführten PCR bei der jeweiligen Probe

Zwei Beispiele für Proben, bei denen die Peak-Ratio ≤ 2.0 war zeigt Abb. 13:

Abb. 13: Profile von Proben mit einer Peak-Ratio ≤ 2 1a) FR2-PCR: Peak-Ratio $\leq 2,0$: 541/01 (Ratio 1,8)

1b) 541/01 1. Wdh. (Ratio 2,2)

2a) FR3-PCR: Peak-Ratio $\leq 2,0$: 18/26k (Ratio 2,0)

2b) 18/26k 1Wdh. (Ratio 1,9)

Zählt man die nicht eindeutigen Fälle mit zu den monoklonalen Ergebnissen, so erhöht sich die Sensitivität bei FR1 um 3 % auf 50%, bei FR2 um 6% auf 22%, und bei FR3(sn) um 6% auf 35%. Die Gesamtsensitivität bleibt allerdings bei 60%. (Alle Prozentangaben beziehen sich auf die Proben, bei denen ein Amplifikat produziert werden konnte.)

3.4.2 Das Auftreten sogenannter „Pseudoklonalität“

Pseudoklonalität ist dadurch definiert, dass die Fragmentgrößen des monoklonalen Peaks einer Probe bei Wiederholung der PCR variieren bzw. der monoklonale Peak bei der Wiederholung nicht mehr vorhanden ist. Bei der Untersuchung der Proben fiel auf, dass das Auftreten von Pseudoklonen bei den geschachtelten PCR häufig ist. Bei der FR1-PCR trat bei 3 von den 63 untersuchten Proben Pseudoklonalität auf. Das ist ein Anteil von etwa 5%, bzw. bezogen auf die amplifizierbaren Proben ein Anteil von 7%. Bei zwei dieser Proben zeigte keine der anderen drei durchgeführten PCR ein monoklonales Amplifikat. Somit hätte die Beurteilung „monoklonal“ zu einem falsch positiven Gesamtergebnis geführt. Bei allen 6 Profilen (pro Probe zwei PCR-Analysen) der drei Proben bei denen Pseudoklonalität auftrat, stellten sich ein oder zwei klonale(r) Peak(s) ohne polyklonalen Hintergrund dar.

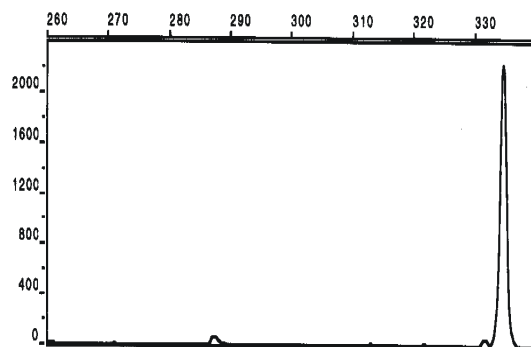
Drei der mit der FR1-PCR(n) untersuchten Proben zeigten ein pseudo-oligoklonales Amplifikat (4% bzw. 7% bezogen auf die amplifizierbaren Proben).

Bei der FR3-PCR(sn) waren 2 von 63 untersuchten Proben (3%) pseudoklonal. Bei einer Probe hätte dies zu einer falsch positiven Gesamtbeurteilung geführt. Fünf untersuchte Proben zeigten ein pseudo-oligoklonales Profil (8%).

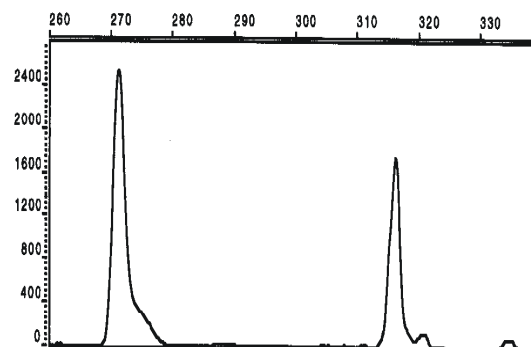
Der Anteil pseudoklonaler Ergebnisse war mit 16% bzw. 17% (bezogen auf die amplifizierbaren Proben) bei der FR2-PCR(n) am höchsten. Pseudooligoklonalität war in 8% bzw. 9% der untersuchten Proben nachweisbar. Die Abbildung 14 zeigt Beispiele für pseudoklonale Ergebnisse, die Abbildung 15 Beispiele für pseudo-oligoklonale Ergebnisse:

Abb. 14: Beispiele für pseudoklonale Ergebnisse:

1. FR1-PCR(n):

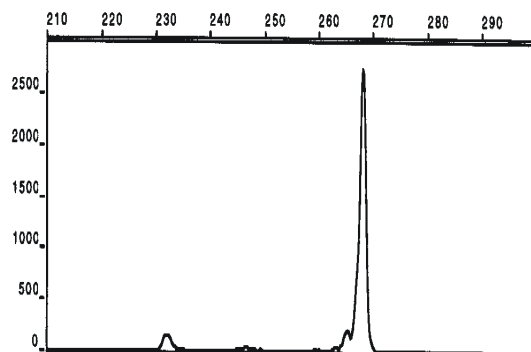


a) 5334 (mono bei 334bp)

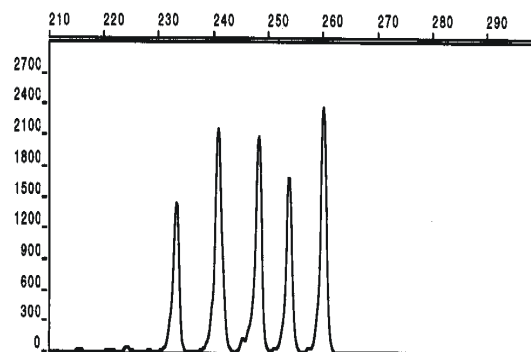


b) 5334 1.Wdh. (biallel bei 271bp;316bp)

2. FR2-PCR(n):

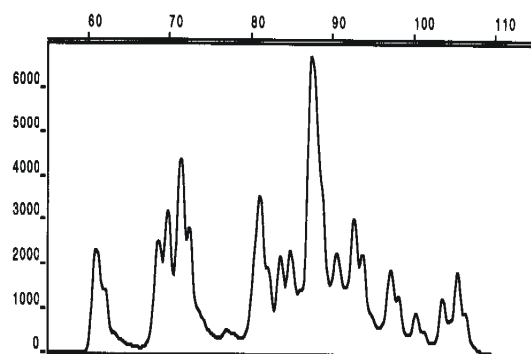


a) 5334 (mono bei 268bp)

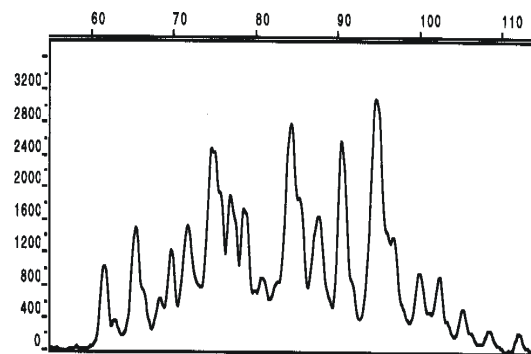


b) 5334 1.Wdh. (oligoklonal)

3. FR3-PCR(sn):



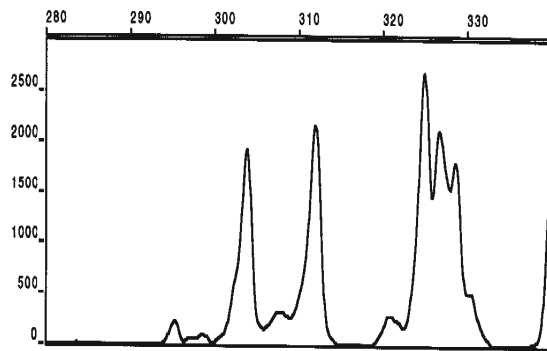
a) 8624 (mono bei 87bp)



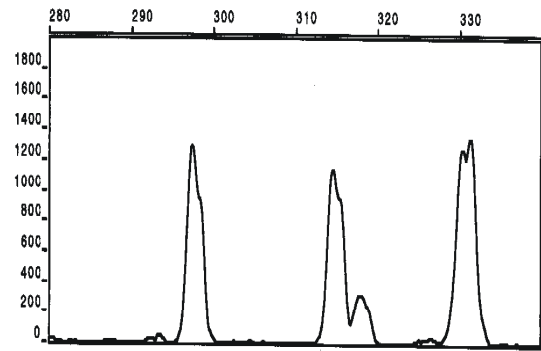
b) 8624 1.Wdh. (oligoklonal)

Abb. 15: Beispiele für pseudo-oligoklonale Ergebnisse

1. FR1-PCR(n):

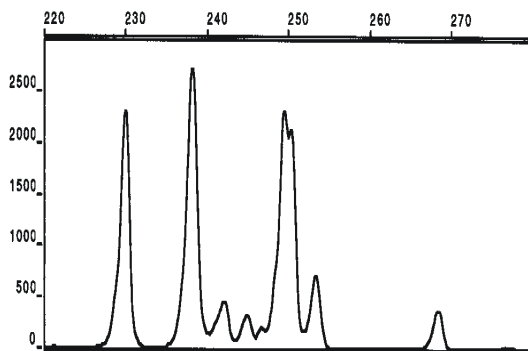


a) 455/01

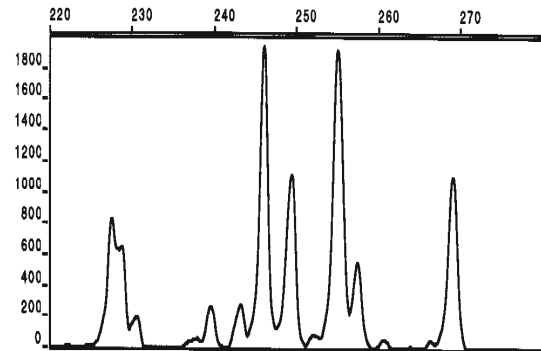


b) 455/01 1.Wdh.

2. FR2-PCR(n):

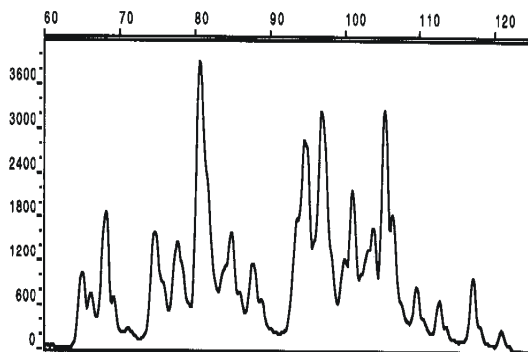


a) 1128/01

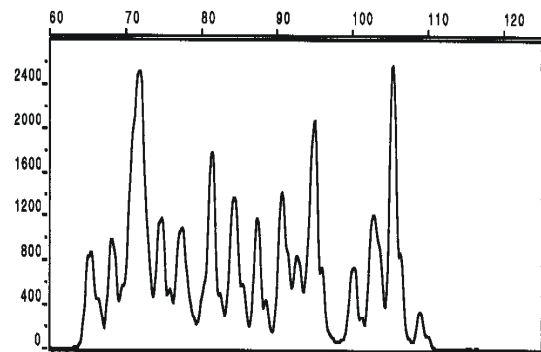


b) 1128/01 1.Wdh.

3. FR3-PCR(sn):



a) 5334



b) 5334 1.Wdh.

Bei der FR3-PCR(s) fanden wir keine Pseudoklonalität. Es wurde deshalb untersucht, ob die Pseudoklone gerade dann erzeugt werden, wenn in der FR3-PCR(s) kein Produkt amplifiziert werden konnte. Für die DNA, die älter als 3 Monate war, wurde die FR3-PCR(s) wiederholt. Die Ergebnisse dazu zeigt die Tabelle 30:

Tab. 30: Zusammenhang von Pseudoklonalität und negativer Routine FR3-PCR

PCR	Pseudoklone	k.A. bei FR3-PCR(s)
FR1(n)	3	1
FR2(n)	10	8
FR3(sn)	2	2

Es wird ersichtlich, dass ein Zusammenhang zwischen dem Ergebnis k.A. bei der FR3-PCR(s) und pseudoklonalem Ergebnis bei den anderen PCR bestehen könnte. Eine verallgemeinernde Aussage kann nicht getroffen werden, da die Probenanzahl zu gering ist.

Um zu untersuchen, ob das Alter der Probe beim Auftreten von Pseudoklonen eine Rolle spielt, wurden die länger gelagerten DNA-Proben je nach Alter in drei Gruppen, entsprechend der Tab. 31 eingeteilt:

Tab. 31: Beziehung zwischen Pseudoklonalität und Alter der Probe

Alter der Probe	Probenanzahl	Pseudoklone gesamt	%	Pseudo FR1(n)	%	Pseudo FR2(n)	%	Pseudo FR3(sn)	%
bis 3 Monate	41	4	10%	1	2,5%	2	5%	1	2,5%
bis 12 Monate	6	1	17%	0	0%	1	17%	0	0%
älter	17	10	59%	2	12%	7	41%	1	6%

Die Tabelle 29 macht deutlich, dass vor allem Proben, die älter sind als ein Jahr, bei der Analyse häufiger falsch klonale Ergebnisse im Sinne von Pseudoklonen erzeugen. Eine Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass die DNA dieser Proben schon so degradiert ist, dass es zu einem „sampling error“ führt. (Sampling error bedeutet, dass nur noch wenige Kopien von IgH-Rearrangements vollständig erhalten sind, die dann, je nachdem welche Rearrangements bevorzugt amplifiziert werden, zur Imitation klonaler Banden unterschiedlicher Größe in der Elektrophorese führen.).

Die Ursache für die Entstehung von Pseudoklonen insbesondere bei der FR2-PCR könnte sein, dass es aufgrund der vielen Dimerbildungen des degenerierten FR2-Primers zu einer Inhibition der einzelnen Primervarianten untereinander kommt, so dass nur wenige für die Amplifikation zur Verfügung stehen. Diese erkennen dann auch nur eine kleine Auswahl von IgH-Rearrangements und könnten so ein pseudoklonales Ergebnis hervorrufen.

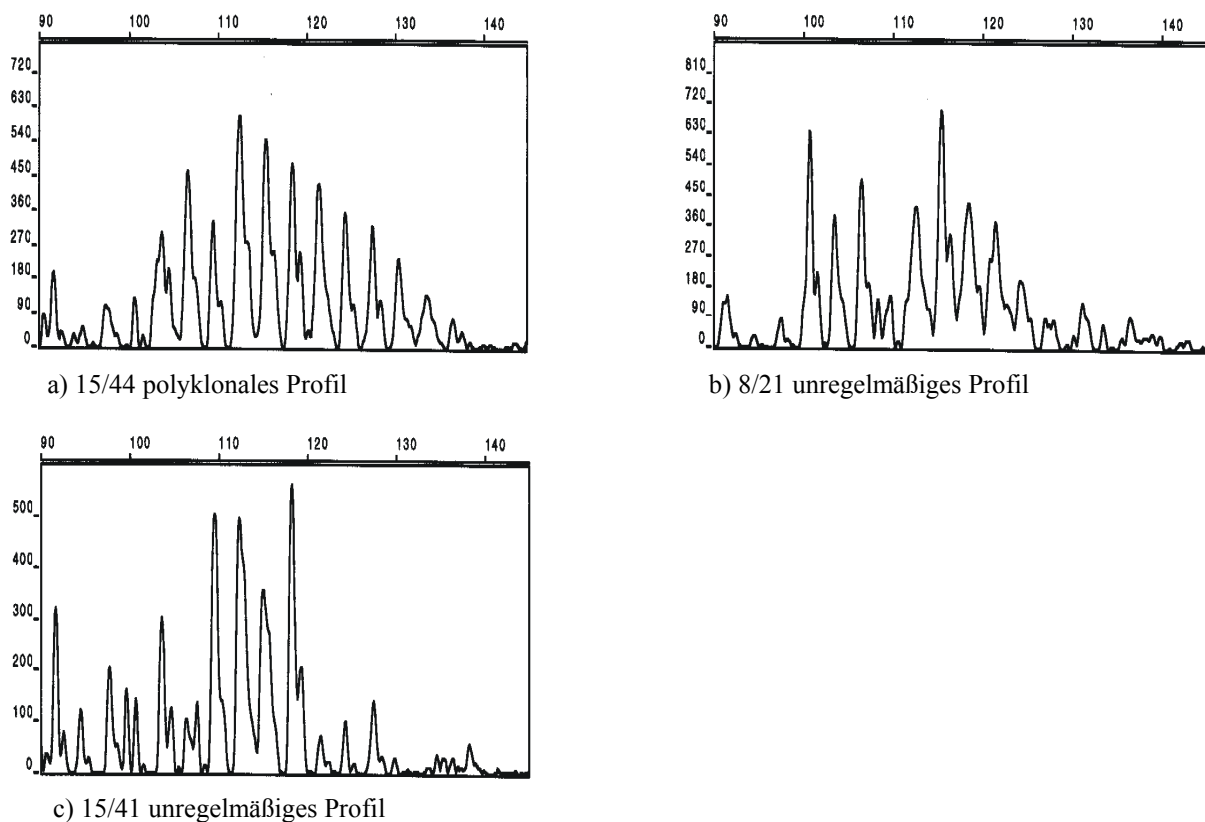
3.4.3 Untersuchung falsch polyklonaler Proben mit der PCR 3.3. (Fodinger et al.)

Bei acht Patienten der Gruppe 1, die in allen vier angewandten PCR [FR1(n);FR2(n);FR3(sn);FR3(s)] ein polyklonales Ergebnis zeigten, wurde die FR3-PCR 3.3 nach *Fodinger et al.* (1999) (s. 2.2.3) an Kryoproben dieser Patienten durchgeführt, um herauszufinden, ob diese PCR zusätzliche monoklonale Ergebnisse liefert. Der FR3-Primer dieser PCR bindet weiter 5' im VH-Gen. Möglich wäre also, dass mit dieser PCR B-Zell-Klone

erfasst werden, die mit der FR3-PCR(sn) bzw. mit der FR3-PCR(s) nicht amplifiziert werden konnten, da sie in dem Bereich, wo die FR3-Primer dieser beiden PCR binden, mutiert sind.

Dennoch wurde bei keiner der acht Proben Klonalität gefunden. Entweder sind die B-Zell Klone dieser Patienten auch in diesem Primerbindungsbereich mutiert, oder die Konzentration an dominanter DNA reicht nicht aus, um im Genescan eine klonale Bande zu erhalten. Insgesamt waren die Profile der Proben sehr unregelmäßig. Das heißt es zeigte sich kein typisches polyklonales Verteilungsmuster, sondern es fehlten Peaks im Profil oder einige Peaks ragten über die Kurve hinaus. Eine Auswahl an Profilen zeigt die Abbildung 16:

Abb. 16: FR3 (Fodinger et al. 1999):



3.5 Analyse der Kontrollen (Gruppe 2)

Alle PCR-Ansätze ausgenommen einige der FR2-PCR(n) zeigten ein polyklonales Muster: Bei zwei Proben von Patienten mit Pyodermie zeigte sich nach der FR2-PCR(n) ein reproduzierbarer klonaler Peak im Produkt. Bei einer Probe war die Ratio der Peaks bei beiden PCR-Analysen >2 und somit nach unserer Definition sicher monoklonal. Da für Pyodermien bisher keine klonalen Infiltrate in der Literatur beschrieben worden sind, und weder Histologie noch Klinik einen Anhalt für ein CBCL bot, ist die Beurteilung des Ergebnisses schwierig („sampling error“?).

Auch bei dieser Untersuchung trat Pseudoklonalität auf. Der Anteil an pseudoklonalen Ergebnissen für die FR2-PCR(n) war bei beiden Gruppen ähnlich hoch: Gruppe 1: 17%, Gruppe 2: 20%. Die Tabelle 32 gibt eine Übersicht über die untersuchten Fälle:

Tab. 32: PCR-Ergebnisse der 2. Gruppe (Kontrollen)

R - Nr.	Diagnose	1.PCR	FR1(n)	FR2(n)	FR3(s)	FR3(sn)
79	Pseudolymphom	1.PCR	k.A.	p	p	p
111	Pseudolymphom	1.PCR	(p)	p	p	p
123	B-Zellreiche MF	1.PCR 2.PCR	k.A.	m(2,2) ol	p	p
200	Pseudolymphom	1.PCR 2.PCR	k.A. k.A.	m(n.mgl. *) ol	p	p
296	B-Zellreiche MF	1.PCR 2.PCR	k.A. k.A.	m(2,7) p	p	p
336	B-Zellreiche MF	1.PCR 2.PCR	k.A. (p)	p	p	p
304	Pseudolymphom	1.PCR 2.PCR	k.A. k.A.	p p	p	p p
340	Pseudolymphom	1.PCR 2.PCR	p (p)	p p	p	p p
387	Pseudolymphom	1.PCR 2.PCR 3.PCR	p (p)	ol m(2,8) ol	p	p p
440	Pseudolymphom	1.PCR	(p)	p	(p)	p
732/02	Pyodermie	1.PCR 2.PCR	k.A.	ol ol	k.A.	p
615/02	Pyodermie	1.PCR 2.PCR	(p)	ol p	(p)	p
176/02	Pyodermie	1.PCR	k.A.	p	k.A.	p
81/02	Pyodermie	1.PCR	k.A.	p	k.A.	p
8713/01	Pyodermie	1.PCR	k.A.	p	(p)	p
8714/01	Pyodermie	1.PCR	(p)	k.A.	(p)	p
8698/01	Pyodermie	1.PCR	p	p	k.A.	p
8345/01	Pyodermie	1.PCR	k.A.	p	p	p
8347/01	Pyodermie	1.PCR 2.PCR	k.A.	m(3,4) m(2,3)	k.A.	p
8282/01	Pyodermie	1.PCR 2.PCR	k.A.	m(1,9) m(1,8)	(p)	p
8283/01	Pyodermie	1.PCR	k.A.	k.A.	k.A.	p
8100/01	Pyodermie	1.PCR 2.PCR	k.A.	ol p	(p)	p

Legende:

ol: (pseudo)oligoklonal“	* Höhe des Peaks im Genescan: aufgrund des fehlenden Hintergrundprofils ist eine Peakberechnung nicht möglich,
(p): Profil mit geringen Peakhöhen	(in Klammern ist die Ratio angegeben)

Bei der FR1-PCR(n) konnte häufig kein PCR-Produkt erhalten werden. Auch die Proben, bei denen ein Produkt generiert werden konnte, zeigten im Genescan ein Profil, das insgesamt geringe Peakhöhen aufwies („schwaches Profil“). Häufig fehlten einige Peaks innerhalb des Bandenmusters. Die Profile der FR3-PCR(sn) zeigten bei allen untersuchten Proben der Gruppe 2 ein vollständiges Gaußsches-Verteilungsmuster. Die Tabelle 33 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tab. 33: Ergebnisse der Kontrollen

	Proben bei denen ein Produkt generiert werden konnte (n)	Proben zeigen Genescan-Profil mit geringen Peakhöhen (n)	Pseudoklone (n)	monoklonale Fälle (n)	unsicher monoklonale Fälle (n)
FR1(n)	7/22	7 (100%)	0	0	0
FR2(n)	20/22	0	4 (20%)	1 (5%)	1 (5%)
FR3(sn)	22/22	0	0	0	0
FR3-PCR(s)	16/22	6 (38%)	0	0	0

Bei jedem PCR-Ansatz wurde als polyklonale Kontrolle DNA von PBMC gesunder Probanden mit analysiert. Bei diesen Proben konnte bei allen vier verschiedenen PCR immer ein polyklonales Profil mit Genescan nachgewiesen werden.

3.6 Vergleich der molekularbiologischen Resultate mit Klinik und Histologie

Zur Gegenüberstellung von Klinik bzw. Histologie und Molekularbiologie wurden 35 Patienten der Gruppe 1, deren DNA mit allen vier PCR-Assays amplifizierbar war (s. Tab. 27) und 22 Patienten der Gruppe 2 untersucht. Die Untersuchung erfolgte wie beschrieben (s. 3.4 / 3.5). Die beobachteten Peaks wurden anhand der festgelegten Kriterien (s. 3.1) den Kategorien monoklonal oder polyklonal zugeordnet. In Gruppe 1 wurden dabei 60% monoklonale Fälle gefunden, in Gruppe zwei zeigten sich 91% polyklonale Fälle.

Tab. 34: Ergebnisse der PCR nach Auswertung mittels Genescan

	monoklonal n (%)	polyklonal n (%)	gesamt n
Gruppe 1	21 (60 %)	14 (40 %)	35
Gruppe 2	2 (9 %)	20 (91 %)	22

Unter Beachtung der Gruppenkriterien ergibt sich demnach eine relativ hohe diagnostische Spezifität (91%) bei vergleichsweise geringer diagnostischer Sensitivität (60%) der Methoden.

Die niedrige Sensitivität ergibt sich aus verschiedenen Gründen. Die Menge monoklonaler DNA im untersuchten Gewebeschnitt kann so gering sein, dass sich das daraus entstandene Amplifikat in der Elektrophorese nicht vom polyklonalen Hintergrund abhebt (Diaz-Cano 1996, Ritter et al. 1997).

Der Nachweis eines monoklonalen PCR-Produktes bereitet besonders in frühen Krankheitsphasen Schwierigkeiten, da der Anteil klonaler B-Zellen in der Läsion im Verhältnis zu reaktiven B-Zellen noch relativ klein ist (Ritter et al. 1997). Die Patienten der Gruppe 1 wurden nicht nach einzelnen Krankheitsstadien eingeteilt, das Auftreten einer solchen Konstellation als Ursache eines fehlenden Nachweises von Monoklonalität ist möglich. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist dennoch gering, weil in diesen frühen Stadien häufig auch Klinik und Histologie schwierig zu beurteilen sind, eine eindeutige Lymphomhistologie jedoch Einschlusskriterium für das Patientenkollektiv 1 war.

Die Primer selbst können die Ursache sein, da zwar die häufigsten, jedoch nicht alle möglichen Rearrangements des IgH Locus erfasst werden. Daneben sind auch Veränderungen innerhalb rekombinierter IgH Gene im Sinne von Transrearrangements (Hoeve et al. 2000) und Mutationen (Golembowski et al. 2000) einzelner Segmente beschrieben, die eine Amplifikation unterbinden würden, weil zumindest einer der beiden Primer nicht binden kann. Falsch polyklonale Ergebnisse entstehen jedoch immer nur dann, wenn oben genannte Veränderungen im malignen

Klon biallel auftreten oder das zweite Allel in Form von einer Keimbahnkonfiguration bzw. in Form von einem rearrangierten Pseudogen auftritt, welches von den Primern nicht erfasst wird. Weiterhin ergab sich ein technisches Problem bei der Auswertung der Proben. Bei mehreren untersuchten Proben zeigte sich im Genescan ein oligoklonales Profil, d.h. ein Profil mit drei oder mehr dominanten Peaks. Bei der Wiederholung der PCR zeigte sich ein anderes oligoklonales Bild (pseudo-oligoklonal). Eine Überlagerung eines möglichen klonalen Peaks durch „pseudo-oligoklonale“ Banden wäre denkbar.

3.7 Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen PCR-Systeme

Im Gegensatz zur PCR FR3(s) ist es mit den zusätzlich eingesetzten PCR (FR1(n);FR2(n);FR3(sn)) notwendig mehrere PCR-Ansätze je Patient durchzuführen, da es sich 1. um geschachtelte PCR handelt und 2. eine Wiederholung der PCR, aufgrund des Auftretens von Pseudoklonen, nötig ist. Die Frage, ob mit diesem erheblichen Mehraufwand ein Gewinn an diagnostischer Sensitivität bei beibehaltener Spezifität zu erreichen ist, war Ausgangspunkt des Vergleichs der Methoden.

Des weiteren stellt sich die Frage, wie viele PCR-Ansätze sinnvoll kombiniert werden sollten, um bei geringen Arbeitsaufwand eine ausreichend hohe Sensitivität zu erreichen.

Zur Beantwortung der ersten Frage wurde zunächst die PCR FR3(s) mit der Kombination aus vier PCR (FR1(n)-, FR2(n)-, FR3(sn)- PCR und der PCR FR3(s) = Komb.-PCR) verglichen. Die Auswertung basiert nur auf den Proben, bei denen in allen vier PCR ein Amplifikat nachweisbar war (n=35). In Gruppe 1 wurden mit Hilfe der FR3-PCR(s) 40 % (14/35) monoklonale Fälle gefunden. Das entspricht einer diagnostischen Sensitivität von ebenfalls 40 %, entsprechend der Gruppeneinteilung (sicheres CBCL). Nach der Kombination der vier PCR-Assays konnten 60 % (21/35) monoklonale Fälle diagnostiziert werden, die Sensitivität beträgt demzufolge 60 %. Die Tabelle 35 gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse:

Tab. 35: Zusammenfassung der Ergebnisse der Gruppe 1 und 2

Gruppe 1		FR3(s)		Summe	Gruppe 2		FR3(s)		Summe
		mono	poly				mono.	poly	
Komb.-PCR	mono	14	7	21	Komb.-PCR	mono	0	2	2
	poly	0	14	14		poly	0	20	20
Summe		14	21	35	Summe		0	22	22

Um die höhere Empfindlichkeit der Kombinationsuntersuchung zu verifizieren, wurde der Test nach McNemar für nominal skalierte, abhängige Stichproben durchgeführt (Timischl 2000). Als Hypothese H_0 wurde postuliert, dass kein signifikanter Unterschied zwischen PCR FR3(s) und Komb.-PCR besteht. Die Alternativhypothese H_1 war eine signifikant unterschiedliche Sensitivität beider Methoden. Nach Mc Nemar errechnet sich u^2 , indem das Quadrat der

Differenz von jeweils in einem Verfahren monoklonalen Fällen $[(0-7)^2=49]$ durch die Gesamtanzahl der in beiden Methoden unterschiedlich bewerteten Fälle $[0+7=7]$ dividiert wird (Timischl 2000). Der Wert für u^2 beträgt demnach 7. Bei einem Freiheitsgrad von 1 und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ist der kritische Wert für u^2 3,84. Da u^2 größer als der kritische Wert ist, muss die Hypothese H_0 abgelehnt werden. Es gilt H_1 , innerhalb des untersuchten Kollektivs von an CBCL erkrankten Personen besteht ein signifikanter Unterschied der Sensitivitäten beider Methoden. Unter Einbeziehung der oben errechneten Prozentwerte ist die diagnostische Sensitivität der Kombination der vier PCR innerhalb der Stichprobe signifikant höher.

Eine weitere Möglichkeit einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Testmöglichkeiten zu erkennen, ist die Berechnung eines Konfidenzintervalles für die entsprechenden Testergebnisse (Timischl 2000). Da die Anzahl der untersuchten Proben $n > 20$ und die Anzahl der monoklonalen Proben (m) $10 \leq m \leq n-10$ beträgt, kann man in folgender Weise vorgehen:

$$h - z_{1-\alpha/2} \times \sqrt{h \times (1-h)/n} \qquad h + z_{1-\alpha/2} \times \sqrt{h \times (1-h)/n} \qquad (\text{Timischl 2000})$$

h: relative Häufigkeit mit der das erwartete Ergebnis eintritt

$z_{1-\alpha/2}$: Wert der Verteilungsfunktion für einen Fehler α von 5%=1,96

n: Stichprobenumfang

Setzt man für $h=p=0,4$ für die FR3(s)-PCR und für $n=35$ so ergibt sich ein Konfidenzintervall von 24%-56%. Analog ergibt sich für die Kombination aller PCR ein Konfidenzintervall von 54%-76%. Das heißt tendentiell bringt Kombination aller PCR ein besseres Ergebnis, ein signifikanter Unterschied besteht bei dieser Methode allerdings nicht.

Im zweiten Kollektiv wurden mit der PCR FR3(s) nur polyklonale Fälle gefunden, was einer diagnostischen Spezifität von 100 % innerhalb der Stichprobe entspricht. Bei der FR2-PCR(n) wurde zweimal ein monoklonales Amplifikat nachgewiesen. Die Spezifität der Kombination aller PCR beträgt daher nur 91%. Statistisch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden gefunden werden. (s. Tab. 36)

Tab. 36: Erfassung der Signifikanz des Unterschiedes der Spezifität mit dem Test nach McNemar

H_0 : Spezifität(FR3(s)) = Spezifität (Komb.-PCR)	Freiheitsgrad= 1
H_1 : Spezifität(FR3(s)) \neq Spezifität (Komb.-PCR)	Irrtumswahrscheinlichkeit= 5%
$u^2 = (2-0)^2 / (2+0)$	kritischer Wert für $u^2 = 3,84$
$u^2 = 2$	$2 < 3,84$
	$\rightarrow H_0$ angenommen

(Timischl 2000)

Die kombinierten PCR erfordern einen erheblichen Arbeitsaufwand. Es sind insgesamt sieben verschiedene PCR-Ansätze pro Probe nötig. Bei Monoklonalität muss die jeweilige PCR

wiederholt werden, um Pseudoklonalität auszuschließen. Ein derartiger Aufwand ist sicherlich in der Routinediagnostik als Screening nicht sinnvoll, aber in Einzelfällen wichtig.

Es sollte versucht werden, mit dem ersten Test möglichst viele Proben mit klonalen B-Zell Infiltraten herauszufinden, da somit eine weitere Untersuchung nicht mehr nötig ist. Eine Übersicht über die Sensitivitäten, die sich aus der jeweiligen Kombination verschiedener PCR ergeben, gibt Tab. 37.

Tab. 37: Sensitivität der angewandten PCR-Methoden

					FR3(s)+						FR3(s)+					FR3(s)+
	FR3s	FR1n	FR2n	FR3sn	FR1n	FR2n	FR3sn	FR1n+ FR2n	FR1n+ FR3sn	FR2n+ FR3sn	FR1n+ FR2n	FR1n+ FR3sn	FR2n+ FRsn	FR1n+ FR2n+ FR3sn	FR1n+ FR2n+ FR3sn	
m/n	14/46	17/36	8/49	15/51	19/35	16/44	17/46	17/35	20/36	18/48	20/35	21/36	19/45	21/36	<u>21/35</u>	
%	30,4%	47,2%	16,3%	29,4%	54,3%	36,4%	37,0%	48,6%	55,6%	36,0%	57,1%	58,3%	42,2%	58,3%	<u>60,0%</u>	

n: Patientenproben mit amplifizierbarer DNA; m: Patientenproben monoklonal

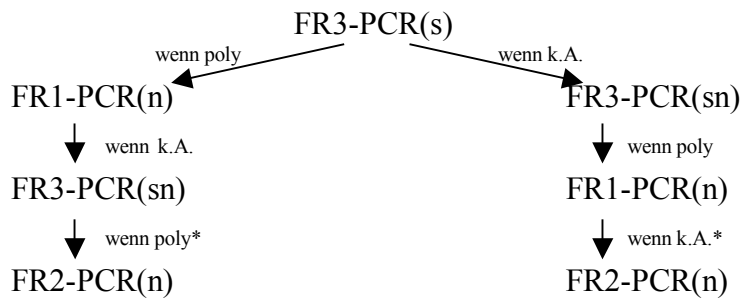
Die größte Sensitivität hat die FR1-PCR mit 47%. Nachteilig ist, dass in 7% der amplifizierbaren Proben Pseudoklonalität auftrat. Ein Nachweis über die Reproduzierbarkeit eines monoklonalen Ergebnisses ist daher zwingend erforderlich. Da es sich um eine geschachtelte PCR handelt, sind somit vier PCR-Ansätze nötig. Ein weiterer Nachteil ist, dass in 30% der untersuchten Proben kein Amplifikat erhalten wurde. Aufgrund dieser Umstände scheint die FR1-PCR für DNA aus Paraffinschnitten als initiale Methode nicht geeignet.

Eine gleichhohe Sensitivität weisen die halbgeschachtelte und ungeschachtelte FR3-PCR auf (29% bzw. 30%), wahrscheinlich aufgrund ähnlicher Bindungsstellen am Genom. Aus zweierlei Gründen scheint die ungeschachtelte FR3-PCR geeigneter zu sein: 1. es ist nur ein Ansatz pro PCR nötig, 2. es trat keine Pseudoklonalität auf, so dass eine Wiederholung der PCR zur Überprüfung der Ergebnisse nicht unbedingt erforderlich ist. In ca. 30% der CBCL ist somit mit nur einem PCR-Ansatz ein Klonnachweis möglich. Daher sollte lediglich wenn mit der ungeschachtelten FR3-PCR kein Amplifikat erhalten werden kann, die FR3-PCR(sn) angewandt werden.

Danach muss entschieden werden, mit welcher PCR die restlichen ca. 70% der Proben weiter untersucht werden sollten. Die höchste, von uns erreichte Sensitivität, die bei der Kombination von zwei PCR erreicht werden kann, ergibt sich aus der Kombination der PCR FR3(s) mit der FR1-PCR und beträgt 54%. Mit nur insgesamt fünf PCR-Ansätzen werden somit bereits etwa 90%, der mit der Kombination aller vier PCR als monoklonal diagnostizierbaren Proben, erfasst. Die restlichen 10% können mit der FR3-PCR(sn) und der FR2-PCR(n) erkannt werden. Ob sich der Aufwand von zusätzlichen vier PCR-Ansätzen lohnt, um die Sensitivität von 54% auf 60% zu erhöhen, sollte von Fall zu Fall entschieden werden. Die FR2-PCR(n) sollte jedoch nur verwendet werden, wenn alle andere Möglichkeiten erschöpft sind, da die Validität der PCR

aufgrund des hohen Anteils an Pseudoklonen und der geringeren Spezifität fraglich ist. So kann folgendes Schema empfohlen werden:

Abb. 17: Fließschema für die PCR-Diagnostik:



*nur wenn das molekularbiologische Ergebnis unbedingt erforderlich ist

3.8 Statistische Bewertung

Um die Ergebnisse des Tests auf die Gesamtpopulation übertragen zu können, müsste die Stichprobe genügend groß gewählt werden. Nach *Clauß und Ebner* (1978) berechnet sich die Stichprobenmindestgröße bei nominalskalierten Daten nach der Beziehung $n \geq u^2 \cdot p \cdot (1-p) / e^2$ (n: Umfang der Stichprobe, u: der u-Wert, der dem gegebenen Sicherheitsniveau entspricht, p: relative Häufigkeit, e: Absolutbetrag der Abweichung des empirischen relativen Häufigkeitswertes vom entsprechenden Parameter).

Bei einem Freiheitsgrad von 1 und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% liegt der kritische u^2 - Wert bei 3,84.

Ähnliche Untersuchungen ergaben eine Häufigkeit des monoklonalen Ergebnisses von etwa 65% bei CBCL (Cerroni et al. 1997, Boulloc et al. 1999, Alaibac et al. 2001, Child et al. 2001). Für die Variable p galt demzufolge dieser Wert, wegen der großen Differenzen zwischen den einzelnen Publikationen wurde $e=20\%$ gewählt. Für Gruppe 1 folgt, dass der Stichprobenumfang größer als 22 sein muss. Für Gruppe 2, wo p nahe 100% liegen sollte, wurde $p=95\%$ und $e=5\%$ gesetzt, es ergibt sich, dass $n>73$ sein muss.

Aufgrund der zu kleinen Stichprobengröße in Gruppe 2 können die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die Gesamtpopulation übertragen werden. Außerdem war die Auswahl der Kontrollen nicht zufällig, da nur Material von diagnostischen Hautbiopsien, nicht aber von Gesunden untersucht werden konnte. Die quantitativen Ergebnisse der Vergleiche sollten nicht über die Stichprobe hinaus als uneingeschränkt gültig betrachtet werden, qualitativ ist jedoch mit einer höheren Sensitivität und gleichbleibender Spezifität bei der Kombination der vier PCR zu rechnen.

3.9 Analyse der nicht primär kutanen Lymphome (Gruppe 3)

Insgesamt wurden sechs Patienten mit einem primär extrakutanen Lymphom untersucht. Eine Ausnahme bildet ein Fall von Mycosis fungoides (MF): Die Erkrankung manifestiert sich primär in der Haut, hatte sich aber zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits systemisch ausgebreitet. Obwohl es sich bei MF um ein primär kutanes T-Zell Lymphom handelt, erfolgte die Einteilung in die Gruppe 3, da der Verdacht bestand, daß es auch zu einer klonalen Entartung der B-Zellen gekommen sein könnte.

In vier von sechs Fällen (66%) konnte ein monoklonales Amplifikat nachgewiesen werden (Tab. 38). Die größte Sensitivität hat die FR1-PCR mit 50%.

Tab. 38: Ergebnisse der Gruppe 3:

Art	Material	Proben-Nr.	FR1(n)	FR2(n)	FR3(sn)	FR3(s).
B-NHL	Tonsille	P658	m	p	m	p
B-NHL	Lymphknoten	P757	m	X	ol	k.A.
B-NHL	Hautmetastase	1217/01	p	p	p	p
MF	PBMC	878/01	ol	X	ol	m
MALT-Lymphom	Colonbiopsie	621/01	p	p	p	k.A.
MALT-Lymphom	Lunge	P655	m	m	m	k.A.

Legende:

X: pseudoklonal; ol: oligoklonal

4 Diskussion

4.1 Konventionelle Methoden zur CBCL-Diagnostik

In der Diagnostik kutaner B-Zell-Lymphome kommen zur Zeit eine Vielzahl von Methoden zum Einsatz.

Größtes differentialdiagnostisches Problem sind die kutanen lymphatischen Hyperplasien bzw. Pseudolymphome. Standard in der Diagnostik der CBCL ist neben der klinischen Untersuchung die Histopathologie. Für die Diagnose lymphoidzelliger Proliferationen der Haut ist die Beurteilung der Infiltratarchitektur und eine genaue zytomorphologische Charakterisierung der Zellen notwendig. Dies ist schwierig und erfordert intensives Training (Kerl et al. 1994). *Caro und Helwig* (1969) versuchten eindeutige Kriterien für die Unterscheidung von CBCL versus Pseudolymphom zu ermöglichen. Eine Übersicht über diese Kriterien zeigt Tabelle 39:

Tab. 39: Unterschiede von B-Zell Lymphomen und B-Zell Pseudolymphomen

Histologie	B-Zell Lymphom	B-Zell-Pseudolymphom
Architektur	Zunahme des Infiltratvolumens und der Dichte in der Tiefe („bottom heavy“, „cone shaped“), Aufbau asymmetrisch	keilförmige Abnahme des Infiltrats in der Tiefe („top heavy“, „wedge-shaped“), Aufbau symmetrisch
Infiltrat	monomorph, dicht, schlecht abgegrenzt, infiltrierendes Wachstum, adnexielle Strukturen betroffen	polymorph, weniger dicht, gut abgegrenzt
Keimzentren	selten, mit dünnem Randwall (Verlust des zonalen Aufbaus)	oft mit dickem Randwall
Epidermale Veränderungen (Atrophie/Hyperplasie; Hyperkeratose etc.)	selten	häufig
Fibrotische Veränderungen um das Infiltrat	gelegentlich	selten
Gefäße	keine vermehrte Anzahl von Gefäßen	zahlreiche Gefäße mit plumpen Endothelzellen häufig
Eosinophilie/Makrophagen	selten	häufig
Nekrosen	möglich	fehlen

aus (Fritsch 1998, S.642, Santucci et al. 1991, Cerroni und Kerl 1994b)

Das mikroskopische Bild der CBCL ist jedoch abhängig vom Krankheitsstadium und ein fließender Übergang zwischen Pseudolymphom zu Lymphom ist möglich. So fanden *Baldassano et al* (1999) keine Unterschiede in der Architektur des Infiltrats (bottom heavy, top heavy) und keine Unterschiede bezüglich der Eosinophilie bei kutanen lymphatischen Hyperplasien und bei Marginalzonenlymphomen. Entgegen der bisherigen Erkenntnisse konnten sie Keimzentren signifikant häufiger in Marginalzonenlymphomen als in Pseudolymphomen nachweisen.

Biopsien von Läsionen der perivaskulären Dermatitis oder der lymphatischen Infiltration der Haut (Typ: Jessner Kanof) enthalten häufig atypische mononukleäre Zellen, aber wenige

Keimzentren innerhalb des dermalen Infiltrats und der Dermis und sind somit schwer von frühen Infiltraten eines CBCL abgrenzbar (Santucci et al. 1991, Kempf et al. 1999). Fremdkörperreaktionen, z.B. von Tätowierungen oder Insektenstichen, können ebenfalls histologische Merkmale kutaner B-Zell-Lymphome aufweisen (Santucci et al. 1991).

Besonders in frühen Stadien der CBCL ist es deswegen nur selten möglich, anhand einer einzelnen Biopsie eine sichere Diagnose zu stellen. Mehrere, von unterschiedlichen Läsionen und zu unterschiedlicher Zeit entnommene Gewebeproben sind notwendig, um eine endgültige Zuordnung vorzunehmen (Rijlaarsdam et al. 1990). Dies stellt eine höhere Belastung des Patienten dar.

Immunhistochemische Untersuchungen gehören heute zu den etablierten Verfahren in der Diagnose kutaner Lymphome. Die Immunphänotypisierung gestattet in Zweifelsfällen die Abgrenzung von nicht lymphatischen großzelligen undifferenzierten Tumoren sowie die Unterscheidung von B- und T-Zelltumoren (Kerl et al. 1994). Dies trifft jedoch nur eingeschränkt für die Früherkennung des Krankheitsbildes zu (Arnold et al. 1983).

Für die Differentialdiagnose gegenüber benignen Hautinfiltraten ist die Analyse der Immunglobulinleichtketten bedeutsam. Monotypische Leichtkettenexpression deutet auf ein CBCL hin (Santucci et al. 1991). Ein Nachweis dieser gelingt in etwa 60% der CBCL (Baldassano et al. 1999).

Wenn aber in der initialen Phase eines malignen Prozesses eine große Anzahl von „normalen“ Zellen im Präparat vorhanden ist, ist eine Darstellung der Immunglobulin-Leichtkettenrestriktion nicht möglich (Arnold et al. 1983). Insgesamt ist es aufgrund des hohen Hintergrundsignals durch unspezifische Antikörperbindung manchmal schwer zu beurteilen, ob eine Leichtkettenrestriktion vorhanden ist (Hughes et al. 2001). Hinzu kommt, dass einige B-Zell Infiltrate, benigne oder maligne, keine Immunglobuline exprimieren (Cerroni und Kerl 1994b).

Die unterschiedliche Expression von CDw75 (LN1), die hilfreich ist in der Differenzierung von follikulären Lymphomen von floriden reaktiven follikulären Hyperplasien der Lymphknoten, kann nicht für die Unterscheidung von Pseudolymphomen und kutanen follikulären Lymphomen eingesetzt werden (Cerroni und Kerl 1994b).

Ritter et al. (1994) fanden heraus, dass ein Infiltrat mit >75% B-Zellen, Koexpression von CD-43 (Marker für myeloische Zellen) und CD-20, abnormale CD-45RA-Expression in den Keimzentren und ein Nachweis von PCNA („proliferating cell nuclear antigene“) auf mehr als 30% der Zellen stark auf ein primär kutanes Lymphom hindeutet.

Baldassano et al. (1999) konnten jedoch mit ihrer Studie keine Koexpression von CD20 und CD43 nachweisen. Sie vermuteten, dass es sich bei den CD43+, CD20+ Fällen, beschrieben von

Ritter et al, um andere B-Zell Neoplasien, wie z.B. Mantelzelllymphome gehandelt habe.

Ein weiterer Parameter für die Diagnose eines CBCL ist eine B:T Zell-Ratio >3:1 (Baldassano et al. 1999). Sie ist jedoch nicht bei T-Zell reichen CBCL zu finden (Cerroni und Kerl 1994b). Wenn die Immunohistochemie auch einen großen Fortschritt gegenüber ausschließlich klinischer und histologischer Untersuchungen darstellt, so kommt auch sie an ihre diagnostischen Grenzen.

4.2 Molekularbiologische Methoden zur CBCL-Diagnostik

4.2.1 Nachweis eines klonalen IgH-Rearrangements

Der Nachweis von Klonalität, sowohl mit der Southernblot als auch mit der PCR und den verschiedenen Varianten der Produktanalyse, beruhen auf dem Ansatz, dass jede B-Zelle ihr individuelles Rearrangement besitzt, und dass nur klonale B-Zellen identische Rearrangements haben. *Landa et al* (1993) konnten zeigen, dass die molekularbiologischen Methoden gegenüber der Immunophänotypisierung wesentlich sensitiver sind. Bis auf wenige Ausnahmen gibt es keine entzündlichen oder physiologischen Zustände bei denen eine B-Zell Monoklonalität vorgefunden wird (Kempf et al. 1999).

Aus dem gemeinsamen Ansatz der molekularbiologischen Verfahren ergeben sich neben den Vorteilen auch die grundsätzlichen Nachteile dieser Verfahren:

Das Vorhandensein einer monoklonalen B-Zellvermehrung ist nicht eindeutig pathognomonisch für ein CBCL (Rijlaarsdam et al. 1992, Landa et al. 1993). Es gibt auch benigne Dermatosen mit klonaler B-Zellproliferation, die unter Umständen schwer von den CBCL zu unterscheiden sind: Z.B. die Lymphadenosis cutis benigna (Kempf et al. 1999), die lymphatische Infiltration der Haut vom Typ Jessner Kanof, Fremdkörperreaktionen z.B. Tätowierungen oder Insektenstichreaktionen (Santucci et al. 1991), aber auch chronische Entzündungen der Haut und Autoimmunerkrankungen (Baldassano et al. 1999).

Diese Beobachtung führte zu der Hypothese nach der solche B-Zell Pseudolymphome in Wirklichkeit niedrig maligne kutane B-Zell Lymphome sind (Burg et al. 1994). Der Übergang von einem Pseudolymphom zum kutanen Lymphom ist beschrieben worden (Shelley et al. 1981, Wood et al. 1989, Rijlaarsdam et al. 1992, Hammer et al. 1993).

Das kann nicht allein dadurch erklärt werden, dass die Hautläsionen zuvor klinisch und histologisch falsch diagnostiziert wurden. Des weiteren erklärt dieses Phänomen, warum es nicht möglich ist, eindeutige klinische und histologische Kriterien für die Unterscheidung Pseudolymphom versus CBCL zu finden. Die Bedeutung von „klonalen Pseudolymphomen“ ist unklar, da sowohl Pseudolymphome als auch, bis auf wenige Ausnahmen, die CBCL eine gute Prognose haben.

Die Chance, dass Patienten mit klonalen Pseudolymphomen an einem systemischen Lymphom erkranken ist sehr gering. *Rijlaarsdam et al.*, (1992) empfehlen dennoch eine Eradikation der Hautläsionen und ein Monitoring dieser Patienten.

Neben der Spezifität ist die Sensitivität der Methode von entscheidender Bedeutung. Die monoklonale Proliferation der malignen Zelle findet immer in der Umgebung anderer B-Zellen statt, deren junktionale Region Unterschiede zum Klon aufweist. Im Gegensatz zu Veränderungen, deren Auftreten allein pathognomonisch für eine Neoplasie ist, wie z.B. der BCR-ABL-Rekombination bei etwa einem Drittel aller adulten ALL-Fälle (Bartram 1993), muss bei den genannten Verfahren die Prädominanz einer Veränderung (monoklonales Rearrangement) gegenüber einem Hintergrund ähnlicher Merkmale (polyklonale Rearrangements) dargestellt werden. Insofern ist die Sensitivität in einem hohem Maße von dem Auflösungsvermögen der produkt darstellenden Verfahren abhängig (Trainor et al. 1991).

Ungewöhnliche oder aberrante Rekombinationen sowie Mutationen der einzelnen IgH-Gene können auftreten, die mit den eingesetzten Primern bzw. Sonden nicht erfasst werden und zu falsch negativen Ergebnissen führen (Boulloc et al. 1999, Golembowski et al. 2000).

Dennoch ist die molekularbiologische Technik sensitiver als histologische bzw. immunophänotypische Techniken (Kitamura et al. 1996). *Wood et al.* (1989) konnten zeigen, dass in frühen Infiltraten, die in der Immunphänotypisierung noch keine Leichtkettenrestriktion zeigten, ein klonales Rearrangement bereits nachgewiesen werden kann.

4.2.1.1 Southernblot

Für einen langen Zeitraum war Southern Blotting die meist angewandte Methode zum Klonalitätsnachweis in der Diagnostik kutaner Lymphome. Mit der Entwicklung der PCR-Methoden, wurde das Southern Blotting aufgrund folgender Nachteile abgelöst:

Man benötigt eine große Menge intakter DNA, d.h. ca. 10µg (McCarthy et al. 1990). Da die DNA hochmolekular (30-50kb) (Lehmann et al. 1995) sein muss, ist eine Analyse von Paraffinproben oft nicht möglich (McCarthy et al. 1990). Die Technik ist mit einem hohen Zeitaufwand verbunden, von der DNA-Extraktion bis zur Auswertung werden mindestens 2-3 Tage benötigt. Der gerätetechnische Aufwand ist ebenfalls groß, nicht zuletzt aufgrund der radioaktiven Detektion der Rearrangements (Volkenandt et al. 1994).

Durch unspezifische Adhärenz des radioaktiven Materials an der Membran und durch degradierte DNA kann es entweder zur Maskierung rearrangierter Banden kommen, oder zur Entstehung von pseudoklonalen Banden. Die Interpretation des Blotbildes bereitet Schwierigkeiten, da Banden der Keimbahnkonfiguration und Banden aus dem polyklonalen Hintergrund mit den monoklonalen Banden interferieren (Cossman et al. 1991). Mit der Methode

ist ein Nachweis von klonalen Zellen in einem Gemisch mit polyklonalen Zellen bis zu einem Anteil von 1-5% möglich (Curco et al. 1997).

4.2.1.2 PCR-Techniken

Aufgrund ihrer Vorteile wurde die PCR-Technik für die routinemäßige Diagnostik der CBCL etabliert. Im Gegensatz zum Southernblot werden bei der IgH-PCR wesentlich kleinere Fragmente mit einer Länge von 100 bis höchstens 550 bp untersucht. Aufgrund der exponentiellen Amplifikation während der PCR können vergleichsweise geringe Mengen (20ng) analysiert werden (Hoeve et al. 2000). Dies ist besonders in der Routinediagnostik von Bedeutung, wenn nur kleine Mengen von z.T. degenerierter DNA aus Paraffinschnitten vorhanden sind, und wenn, vor allem bei Hautbiopsien, viele nicht lymphatische Zellen in der Probe vorhanden sind. Weitere Vorteile sind, dass der Zeitaufwand sehr gering ist d.h., die Diagnostik ist innerhalb eines Tages möglich. Auf Radioaktivität kann verzichtet werden (Volkenandt et al. 1994). Nach der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte ist eine weitergehende Analyse, zum Beispiel eine Sequenzierung und Konstruktion patientenspezifischer Primer zur Verlaufskontrolle, möglich.

Die Sensitivität der Methode wird vom Anteil der nichtklonalen Zellen, die ein rearrangiertes IgH-Gen besitzen und vom verwendeten Separationsverfahren bestimmt.

Die Angaben in der Literatur zur Sensitivität der IgH-PCR schwanken je nach Elektrophoresemethode zwischen 0,5%-5% (Mc Carthy et al. 1990, Trainor et al. 1991, Diss et al. 1993, Lehmann et al. 1995, Tierens et al. 1996, Ayling und Iland 1999, Fodinger et al. 1999, Theriault et al. 2000, Elenitoba et al. 2000), einige konnten Klonalität bis 0,001% nachweisen (Brisco et al. 1990, Sugahara et al. 1999). Die Daten beziehen sich auf eine Verdünnung von monoklonaler DNA mit DNA reaktiver Lymphozyten aus Tonsillen oder PBMC. *Nihal et al.* (2000) konnten zeigen, dass die Sensitivität sehr stark vom Anteil der polyklonalen Zellen abhängig ist. Bei der Verdünnung von klonalen Zellen mit einer Karzinomzelllinie SCC-13, welche kein Rearrangement des IgH-Gens zeigt, war die Detektionsrate 0,25-1%, bei der Verdünnung mit DNA einer reaktiven Tonsille lag die Detektionsrate nur noch bei 30-40%. In unserer Untersuchung konnte eine Sensitivität von 0,5% bzw. 2,5% trotz Verdünnung mit DNA von PBMC erreicht werden.

Unabhängig davon, dass wahrscheinlich alle malignen B-Zellerkrankungen klonal auftreten, ist ein monoklonales Analyseergebnis nicht pathognomonisch für ein CBCL wie unter 4.1. beschrieben.

Falsch monoklonale Ergebnisse können aber auch andere Ursachen haben:

Aufgrund der Fähigkeit der PCR DNA-Fragmente millionenfach zu amplifizieren, kann die Kontamination des PCR-Reaktionsgemisches selbst mit geringen Mengen DNA eine starke,

falsch monoklonale Bande in der Elektrophorese produzieren (Volkenandt et al. 1993). Deshalb führten wir bei jedem PCR-Ansatz immer eine Negativkontrolle durch. Sind bei dieser Probe Banden im spezifischen Größenbereich zu erkennen, so ist der gesamte Ansatz zu wiederholen (Diaz-Cano 1996). Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte keine Kontamination festgestellt werden.

Des weiteren kann es bei einem sehr geringen Anteil von B-Lymphozyten im entnommenen Biopstat durch eine exponentielle Amplifikation einer der wenigen im Extrakt enthaltenen IgH-Rearrangements zu einer Imitation monoklonaler Banden kommen (Diaz-Cano 1996, Hoeve et al. 2000, Elenitoba et al. 2000). Bereits bei einer Verdünnung polyklonaler DNA mit plazentärer DNA im Verhältnis von 1:200 bei einer Gesamtkonzentration von 50 ng/μl entstehen pseudoklonale Banden (Elenitoba et al. 2000). *Storch-Hagenlocher et al.* (2000) konnten zeigen, dass es bei einer geringen Konzentration an polyklonaler DNA zur Entstehung von unvollständigen sogenannten oligoklonalen Profilen im Genescan kommt, wie sie auch in unserer Untersuchung beobachtet wurden (3.4.2). Wurde die Konzentration der polyklonalen DNA noch weiter verringert, reduzierte sich das Profil auf nur noch ein oder zwei Banden im Genescan und täuschte so ein falsch klonales Ergebnis vor. Aufgrund dieser Problematik empfiehlt es sich, nicht weniger als 50ng DNA mit einem Anteil an B-Zellen von mindestens 10% (5 ng) in der PCR einzusetzen (Elenitoba et al. 2000). Möglicherweise war der Anteil an B-Zellen in den von uns untersuchten Hautproben nicht immer ausreichend, so das Pseudoklonalität angezeigt wurde.

Die Gefahr ein „pseudoklonales Ergebnis“ zu erhalten, besteht auch dann, wenn jeweils nur ein fam-Primer pro PCR-Ansatz verwendet wird (monoplex-PCR). Z.B. beim Primer für die VH6-Familie, da B-Zellen mit VH6-Rearrangement, aufgrund der Tatsache, dass zu dieser Genfamilie nur ein VH-Gen gehört, im Biopstat unterrepräsentiert sind. Aus diesem Grunde wurden in unserer Arbeit nur fam-Primer im Multiplex-Ansatz verwandt.

Aber auch bei der Verwendung von cons-Primern kann es, aufgrund der Heterogenität im Primerbindungsereich der einzelnen rearrangierten IgH-Gene, zu einer nichtproportionalen Amplifikation einzelner Rearrangements kommen und damit zur Vortäuschung monoklonaler Banden (Zhou et al. 1999, Ritter et al. 1997). Diese Tatsache könnte bei der durchgeführten FR3-PCR(sn) unserer Untersuchungen zu pseudoklonalen Ergebnissen geführt haben.

„Pseudoklonale“ Peaks bzw. Banden, wie auch von uns beobachtet, sind nicht reproduzierbar (Storch-Hagenlocher et al. 2000). So fanden *Ritter et al.* (1997) in 18 von 40 benignen Infiltraten Monoklonalität, aber nur in vier Fällen war die monoklonale Bande reproduzierbar. Aufgrund dieser Tatsache ist es wichtig, jede Probe in zwei unabhängigen PCR-Assays zu analysieren (Brisco et al. 1990, Elenitoba et al. 2000). Außerdem sind hochauflösende Elektrophoresetechniken

(Genescan) zu verwenden, um auch noch geringe Unterschiede in der Größe eines/einer klonalen Peaks/Bande zu erkennen (Hoeve et al. 2000, Storch-Hagenlocher et al. 2000).

Ein weiterer Faktor, der zur Entstehung eines falsch klonalen Ergebnisses beitragen kann, ist die Existenz von mikroklonalen B-Zell Populationen, entstanden durch Antigenstimulation bei einem reaktiven Prozess. Dies wird besonders dann zum Problem, wenn „microdissected“ Material verwendet wird (Elenitoba et al. 2000). (*„Microdissected“ bedeutet, dass unter mikroskopischer Sicht ein suspekt erscheinendes Areal eines histologischen Schnittes zunächst mit einer Nadel mobilisiert wird und dann unter Zugabe eines Wassertropfens aspiriert wird.*) Denn lokal entstandene Mikroklone können reproduzierbare Banden erzeugen und somit den akzeptierten Kriterien für Monoklonalität genügen. Aus diesem Grunde wurde in unserer Untersuchung kein „microdissected“ Material verwandt. Auch wenn höhere Sensitivitäten erreicht werden können (Signoretti et al. 1999), sollten Daten von Untersuchungen mit „microdissected“ Material kritisch bewertet werden (Zhou et al. 1999).

Nicht amplifizierbare DNA, wie auch in unserer Arbeit z.B. bei FR1 in bis zu 30% der Proben vorhanden, kann von verschiedenen technischen Problemen, wie schlechte DNA-Qualität, zu wenig Material, oder Kontamination mit inhibitorisch wirkenden Agenzien (z.B. Ethanol, Schwermetalle) resultieren. Bei dem Vergleich von Kryoproben versus Paraffinproben konnten einige Untersucher eine Gleichwertigkeit beider nachweisen (Hughes et al. 2001), andere wieder konnten zeigen, dass mit Kryoproben bessere Resultate erzielt werden können (Hoeve et al. 2000). In unserer Untersuchung standen nur wenige Kryoproben zur Verfügung, so dass ein Vergleich Kryo- versus Paraffinproben nicht möglich war. Die hauptsächliche Verwendung von Paraffinproben könnte jedoch Ursache dafür sein, dass einige Proben nicht amplifizierbar waren. Falsch polyklonale Ergebnisse, wie in unserer Arbeit zu 40% vorhanden, entstehen, wenn der Anteil klonaler Zellen unter der Sensitivitätsgrenze liegt (Diaz-Cano 1996), oder die Primer nicht binden können. Letzteres kann verschiedene Ursachen haben: Zum einen Mutationen des Primerbindungsgebietes, häufig bei Keimzentrumszelllymphomen (Golembowski et al. 2000). Zum anderen inkomplette Rearrangements oder Translokationen, die den IgH-Komplex mit einbeziehen (Hoeve et al. 2000).

Bei der Verwendung von cons-Primern, die wir für die FR3(sn), FR3(s) und FR2(n) verwandten, besteht die Gefahr, dass bestimmte seltene Rearrangements des VH oder JH-Gens nicht erkannt werden (Hoeve et al. 2000).

Ein weiteres Problem ist die Demaskierung klonaler Banden aufgrund der weiter oben schon erwähnten ungleichen Amplifikation einzelner Segmente oder degradierter DNA, die dann

häufig zu unvollständigen Profilen im Genescan führen und somit Oligoklonalität vortäuschen. Auf diese Möglichkeit wurde in unserer Untersuchung bereits hingewiesen (siehe Abschnitt 3.6.).

4.2.1.2.1 Auswahl des geeigneten Genortes

Es besteht die Möglichkeit das IgH-Gen oder die beiden IgL-Gene κ , λ für die PCR als Matrizen zu verwenden.

Die klonalen Zellen können entweder den κ oder den λ -Genort rearrangiert haben.

Deshalb muss man sowohl für das κ -Gen als auch für das λ -Gen eine PCR durchführen, um alle möglichen Rearrangements zu erfassen. Unter den 76 $V\kappa$ und ca. 70 $V\lambda$ Segmenten gibt es nur wenig Homologien, so dass in der Routine viele PCR-Ansätze nötig wären, um genügend Rearrangements zu erfassen (Hoogeveen et al. 1998). Verschiedene Versuche wurden unternommen, um die Vielzahl der zu amplifizierenden Gensegmente zu reduzieren. *Shiokawa et al.* (1998) verwendeten cDNA. Dies reduzierte die Anzahl der V-Segmente, da nur die funktionalen Segmente als mRNA transkribiert werden. Außerdem konnte man die Schwierigkeit der Amplifikation der verschiedenen J-Segmente umgehen, indem man einen Primer für die konstante Region verwendete. Die Verwendung von mRNA ist allerdings erstens, nur sehr eingeschränkt bei Paraffinproben möglich, und zweitens, durch die ubiquitär vorkommenden RNAsen, sehr störanfällig. Falsch monoklonale Banden können durch Überrepräsentation von Amplifikaten reaktiver B-Zellen entstehen, während klonale Banden durch Amplifikate polyklonaler B-Zellen maskiert werden können.

In der hier durchgeführten Untersuchung wurde nur eine PCR für $V\kappa$ durchgeführt. Die alleinige Verwendung der $V\kappa$ -Segmente erfasst etwa 70% aller B-Zellen und kann somit die Anzahl der PCR-Ansätze reduzieren (Gong et al. 1999).

Ein anderes Problem ist die geringe Längenvariabilität der CDR3-Region von nur 10-15 Basenpaaren aufgrund der fehlenden D-Segmente. Dies macht es schwierig, klonale von polyklonalen Proliferationen bei der Verwendung von Agarose- oder Polyacrylamidgelen zu unterscheiden (Shiokawa et al. 1998). Vermutlich ist dies auch der Grund dafür, dass bei der in dieser Arbeit verwendeten IgL-PCR die Genescan-Analyse nur ein bis zwei breite Peaks zeigte (siehe Abschnitt 3.2.5).

Aufgrund dieser Schwierigkeiten wird fast ausschließlich der IgH-Genlocus für die verschiedenen PCR-Ansätze gebraucht. Er rearrangiert in der B-Zell Entwicklung vor dem IgL-Lokus, so dass auch klonale Zellen, die von einem früheren Entwicklungsstadium ausgehen, erfasst werden. Es handelt sich im Gegensatz zum IgL-Gen nur um einen Genort und durch das D-Segment ist eine ausreichende Längenvariabilität der CDR3-Region vorhanden. Der IgH

Lokus enthält 123 V-Segmente, 25 D-Segmente und 9 J-Segmente (Matsuda et al. 1998). Dreiundachtzig der V-Segmente und drei der J-Segmente sind Pseudogene. Pseudogene sind fehlerhafte Gene, die strukturell einem funktionellen Gen ähneln, deren Produkte jedoch nicht exprimiert werden. Wenn man davon ausgeht, dass alle B-Zellen zumindest ein Allel mit einem funktionalen Rearrangement besitzen, so kann man die Pseudogene bei der Primerwahl vernachlässigen. Sowohl die V- als auch die J-Segmente enthalten homologe Sequenzabschnitte (Framework-Regionen), die die Konstruktion von Konsensusprimern möglich macht. Zusätzlich können Primer für die Leader-Region, die dem V-Segment vorgelagert ist, verwendet werden. Jeweils ein Primer für das V- und einen für das J-Segment pro PCR-Ansatz führen immer zur Amplifikation der CDR3-Region, die den klonspezifischen Marker darstellt.

4.2.1.2.2 Analyse der verwendeten Primerkombinationen

Die Analyse aller Primersysteme erfolgte mit der *Oligo 5.0 Primer Analysis Software*. Dabei wurden die Doppelstrangbildungen der einzelnen Primer sowie der Primer untereinander, die Schmelztemperaturen und die interne Stabilität der spezifischen Primer-DNA-Doppelstränge untersucht (2.2.11.4).

Relevante Doppelstrangbildungen der 3'Enden zeigten sich bei vier der untersuchten JH-Primer, bei zwei Primern für die Leaderregion jedoch nicht bei den FR3-Primern. Bei der Testung der Multiplex-Systeme zeigten alle getesteten Systeme, bis auf die FR3-PCR 3.1 und 3.2 Bindungen dieser Art mit einem Betrag der freien Enthalpie bis 10 kcal/mol. Doch gerade die PCR 3.1 und 3.2, welche laut *Oligo-Programm* gut funktionieren sollten, stellten sich bei der praktischen Testung als nicht geeignet heraus. Damit ist der prädiktive Wert der theoretischen Primersuche in Frage zu stellen.

Die Höhe des dG Betrages für 3' Dimere scheint mit dem Auftreten unspezifischer Banden kleiner Größen zu korrelieren: Während bei der PCR3.5 [FR3-PCR(sn)] mit 3'Dimeren mit einem dG Betrag bis 5 kcal/mol kaum unspezifische Produkte kurzer Längen beobachtet wurden, traten beim Multiplexprimer-System der FR1-PCR mit einem Betrag für dG bis 10 kcal/mol mehrere Banden dieser Art auf (s. 3.2.1.2.2; 3.2.2.2) Die Größe der Produkte entspricht nicht immer der erwarteten Länge für Dimere von etwa 25-40bp. Es zeigen sich häufig größere Banden, die auch von PCR zu PCR variieren können. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine Vergrößerung der Dimere entsprechend einer Primerlänge durch fortwährende Anlagerung der 3'Enden. Eine solche Reaktion entzieht sich aufgrund ihrer Komplexität der Simulationssoftware.

Die 5'Dimere könnten Ursache für eine geringere Ausbeute der PCR sein, wenn ein großer Teil des vorhandenen Primers 5' Doppelstrangbindungen eingeht.

Die Schmelztemperaturen der Haarnadeln lagen bei dem größten Teil der Primer unter 40°C. Da die Anlagerungstemperatur bei allen durchgeführten PCR-Assays mindestens 52°C betrug, stellten die Haarnadeln größtenteils kein Hindernis für den Ablauf der PCR dar.

Bei der Untersuchung der Schmelztemperaturen der einzelnen Primer zeigten die Multiplexsysteme der Leader- und FR1-PCR große Differenzen von bis zu 25°C. Ob dies für die Effizienz der PCR eine Rolle spielte, lässt sich schwer sagen, da auch die anderen unter Punkt 2.2.11.4. beschriebenen Kriterien für das Funktionieren einer PCR wie z.B. Dimerbildungen überschritten wurden. Allerdings zeigte sich auch bei der PCR 3.5 [FR3-PCR(sn)] in der 2. Runde Schmelztemperaturunterschiede bis zu 20°C bei ausreichender Effizienz der PCR.

Bei der Untersuchung der internen Stabilität der Primer ergaben sich auch für effiziente Primer [FR3-Fodinger et al., FR1-Hayashi et al, FR1.1 und FR1.3 -Küppers et al.] nur mäßige Werte. Dieser Parameter scheint demnach von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Eines wurde bei der Untersuchung der Primer mit der Simulationssoftware *Oligo* vor allem ersichtlich: Die Primer mit den degenerierten Basenabfolgen [FR1-Hayashi et al.; FR2 -Ramasamy et al.] stellen ein erhebliches Problem da. Da das Programm die Zeichen für degenerierte Basen (z.B. N für die Basen A, T, G oder C) nicht erkennt, sind alle Varianten einzeln einzugeben. Bei Primern, wo nur an ein oder zwei Stellen in der Basenabfolge zwei verschiedene Basen zur Auswahl stehen, besteht noch die Möglichkeit die daraus resultierenden vier Varianten einzeln mit dem *Oligo* zu untersuchen. Ist der Primer aber stärker degeneriert, wie z.B. der FR2-Primer nach *Ramasamy et al.*, so ergeben sich in diesem Fall schon 128 verschiedene Möglichkeiten. Diese müsste man zunächst alle einzeln untersuchen und anschließend im Multiplex-Programm. Des weiteren wird es bei Multiplex-Primersystemen schwierig sein, die einzelnen Primer so zu verändern, dass man ein zufriedenstellendes Ergebnis bezüglich der Dimerisierung erhält. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen war es häufig so, dass, wenn ein Dimer zwischen zwei Primern beseitigt wurde, eine neue Dimerbildung mit einem anderen Primer entstand.

Dieser Aufwand steht nicht in Relation mit dem daraus resultierenden Nutzen. Denn letztendlich lässt sich doch nicht sicher vorhersagen, ob die PCR sich in der Praxis als effizient erweist, wie das bereits in diesem Abschnitt erwähnte Beispiel mit der PCR 3.1 und 3.2 zeigt.

Trotz der Schwierigkeiten, die bei der Verwendung von Multiplex-Primersystemen auftreten, sind sie von einigen Untersuchern verwendet worden (Deane und Norton 1991, Lehmann et al. 1995) *Meier et al.* (2001) beschrieben eine Multiplex-PCR sogar mit 26 Primern, wiesen aber darauf hin, dass diese PCR nur für Proben mit einem Anteil klonaler Zellen von mindestens 5-10% funktionieren. Darüber hinaus untersuchten sie DNA-Proben von nodulären B-Zell-Lymphomen, welche sich durch einen höheren Anteil von Lymphozyten im Gegensatz zu DNA-Proben der

Haut auszeichnen.

Als Fazit ergeben sich daraus nur zwei Varianten: 1. Reduktion der Primer pro Ansatz durch Verwendung von wenig oder nicht degenerierten Primern und/oder Verteilung der Primer auf mehrere PCR-Ansätze um Dimerbildungen vorzubeugen, 2. Verstärkung der Effizienz der PCR durch Verwendung von geschachtelten PCR-Ansätzen. Ersteres hätte wieder einen großen Arbeits- und Zeitaufwand aufgrund der vielen PCR-Ansätze zur Folge. Deshalb wurde zur Bearbeitung der Aufgabenstellung auf die zweite Möglichkeit zurückgegriffen.

4.2.1.3 Wahl der Elektrophoresemethode

Für die Darstellung der Amplifikate stehen verschiedene Elektrophoresemethoden zur Verfügung: AGE, TGGE, CE (Kapillarelektrophorese-Genescan), PAGE (Polyacrylamidelektrophorese), DGGE (Denaturierende Gelelektrophorese), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). Die AGE sollte nicht verwendet werden, da aufgrund der geringen Auflösung eine Unterscheidung zwischen mono- und polyklonalen Amplifikaten nicht möglich ist (Aubin et al. 1995). Sie wurde in dieser Untersuchung nur zur Feststellung, ob ein Amplifikat vorhanden ist, verwendet.

Die für die Untersuchung der CBCL gewählte CE auf automatischen DNA-Sequenziergelen bietet mehrere Vorteile gegenüber den herkömmlichen Elektrophorese-Methoden: Durch die Auswertung der CE mit einer geeigneten Software können Längenunterschiede von einer Base detektiert werden. Anhand der Fragmentprofile aus verschiedenen Proben kann man so vergleichende Aussagen bezüglich des Klons machen, ohne zu Sequenzieren (Beaubier et al. 2000). Zusätzlich können durch die exakte Größenbestimmung Kontaminationen erkannt werden und so falsch klonale Ergebnisse vermieden werden. Die Grenze zwischen Polyklonalität und Monoklonalität wird durch die Berechnung der Ratio des klonalen Peaks objektivierbar (Lukowsky et al. 2002). *Derkson et al.* (1999) verglichen die PAGE, die SSCP mit radioaktiv markierten Primern und die CE mit fluoreszenzmarkierten Primern. Die CE hatte mit 69% die höchste Sensitivität, allerdings war der Unterschied zu den anderen Methoden nicht signifikant.

In den Verdünnungsreihen konnte eine höhere Sensitivität der CE gegenüber anderen Elektrophoresemethoden nachgewiesen werden (Galimberti et al. 1999, Beaubier et al. 2000).

Zusätzlich ergeben sich noch einige technische Vorteile: Der Arbeitsaufwand ist geringer, da die Analyse mit dem Genescan automatisiert abläuft, und somit keine Zeit für die Gelherstellung und anschließende Färbung aufgewandt werden muss. Eine verminderte Abhängigkeit von Polyacrylamid und seiner Toxizität ist ein weiterer Vorteil der CE. Nachteilig sind das teure Equipment und die höheren laufenden Kosten für die Reagenzien und Kapillaren (Beaubier et al. 2000).

4.3 Diskussion der Vergleichsuntersuchungen

4.3.1 Gruppeneinteilung

Um bei differenten Analyseergebnissen verschiedener PCR einschätzen zu können, welches der beiden Resultate richtig ist, war die Einteilung in zwei Gruppen mit vorhersagbarer Klonalität unumgänglich. Dabei dienten Klinik und Histologie als Grundlage der Zuordnung. Unter diesen Bedingungen ist auch eine Korrelation von Klinik bzw. Histologie und Molekularbiologie möglich.

Gruppe 1 wurde als Kollektiv von Patienten definiert, deren Infiltrat monoklonal sein sollte, also Proben von Patienten mit klinisch und histologisch sicheren kutanem B-Zell Lymphom. Bei Patienten der Gruppe 2 wurde klinisch und histologisch ein CBCL ausgeschlossen. In Gruppe 3 wurden Patienten mit einem gesicherten Lymphom, welches sich systemisch manifestierte, eingeordnet. Ungeachtet dessen können in Gruppe 1 als auch in Gruppe 3 polyklonale Fälle auftreten, z.B. in den Anfangstadien, wenn die Anzahl monoklonaler Zellen unter der Nachweisgrenze des angewandten Verfahrens liegt (Diaz-Cano 1996), oder in fortgeschrittenen Stadien von B-Zell-Lymphomen, bei denen durch Mutationen keine Primerbindung mehr erfolgen kann (Golembowski et al. 2000, Galimberti et al. 1999). Ein klonales Ergebnis in Gruppe 2 ist zu erwarten, wenn einem CBCL mit unspezifischem klinischen und histologischen Bild eine andere Diagnose zugeordnet wurde bzw. wenn es sich um Diagnosen handelt, bei denen ein klonales Rearrangement in der Literatur beschrieben wurde (Rijlaarsdam et al. 1992, Landa et al. 1993). Die Auswahl der Patienten aus Gruppe 2 erfolgte nicht zufällig, sondern nur für Probanden, bei denen eine Probebiopsie entnommen wurde. Dies hat aber auch den Vorteil einer Fokussierung auf differentialdiagnostisch wichtige Dermatosen.

4.3.2 Ergebnisse des Vergleichs der PCR-Ansätze

Der Einsatz gleicher Mengen identischer DNA-Extrakte und ein identisches Verfahren zur Produktseparation erlaubten den Vergleich der verschiedenen PCR-Ansätze, da nur das Bindungsverhalten der verwendeten Primer Einfluss auf die Ergebnisse hatte.

Unterschiedliche Ergebnisse waren in erster Linie aufgrund der unterschiedlichen Erfassung der Segmente in beiden Systemen zu erwarten.

Mit 47% war die FR1-PCR die sensitivste, mit 16% die FR2-PCR die mit der geringsten Detektionsrate. Die höchste Sensitivität mit 60% ergab sich aus der Kombination aller vier PCR. Frühere PCR-Studien für die Detektion klonaler Populationen in systemischen B-Zell Lymphomen haben Sensitivitäten zwischen 40% und 100% berichtet. Eine Auswahl der wichtigsten Studien zeigt Tabelle 40:

Tab. 40: Ergebnisse verschiedener Arbeiten zu nodulären Lymphomen bzw. Leukämien

Referenz	Lymphom-Typ	verwendete PCR	Monoklonal
Trainor et al. 1990	NHL, CLL	sn FR3	39/52 (75%)
Deane et al. 1991	ALL, CLL	sFR1 multi	109/116 (94%)
Ramasamy et al. 1992	ALL, NHL, CLL, MM	sn FR2	18/22 (82%)
Diss et al. 1993	MALT, CB/CC, CLL	sn FR2 und sn FR3	85/94 (90%)
Aubin et al. 1995	FCCL, MCL	sFR3, sFR2, sFR1cons, sFR1 multi	253/351 (72%)
Lehmann et al. 1995	NHL, CLL	sFR3, sFR1 multi	54/60 (90%)
Kitamura et al. 1996	NHL	nFR3, nFR2	27/31 (87%)
Linke et al. 1997	NHL, CLL, ALL	sn FR3	17/20 (85%)
Galimberti et al. 1999	NHL	sFR3, sFR2	34/46 (69%)

Legende:

NHL: Non-Hodgkin Lymphom	FCCL: Follikel-Zentrumszell-Lymphom
CLL: Chronisch lymphatische Leukämie	MM: Multiples Myelom
ALL: Akute lymphatische Leukämie	MALT: Lymphom des Mucosa assoziierten lymphatischen Gewebes
MCL: Mantelzelllymphom	cb/cc: zentoblastisch/zentrozytisches Lymphom

Wenige Studien wurden bisher zu den CBCL durchgeführt. Auch hier schwanken die Detektionsraten stark (Tab.41):

Tab. 41: Eine Auswahl der Studien zu CBCL

Referenz	Lymphom-Typ	verwendete PCR	Monoklonal
Ritter et al. 1997	CBCL	sn FR3	12/35 (34%)
Cerroni et al. 1997	CBCL (MZL)	sn FR3	18/26 (69%)
Boulloc et al. 1999	CBCL	s FR3	35/52 (66%)
Signoretti et al. 1999	CBCL	sn FR3	4/10 (40%)
Nihal et al. 2000	CBCL(12), NHL(6), Zelllinien (7)	n FR1 multi, s FR3	17/25 (84%)
Alaibac et al. 2001	CBCL (nur FCCL)	s FR1	10/15 (66%)
Child et al. 2001	CBCL	s FR1, s FR3, s leader	31/39 (79%)

Insgesamt ist zu erkennen, dass die Detektionsraten der Studien mit CBCL wie auch in unserer Arbeit kleiner sind, als die der systemischen Lymphome. Diese geringere Sensitivität könnte die häufiger auftretende somatische Hypermutation der VH-Region widerspiegeln, die zu einem Versagen der Amplifikation führt (Diss et al. 1993, Aubin et al. 1995). FCCL, MZL und „high grade“-Lymphome extranodalen Ursprunges zeigen hohe Mutationsraten, welches die geringere Detektionsrate gegenüber der B-CLL oder den Mantelzelllymphomen erklären würde (Essop et al. 1997, Hoeve et al. 2000). CBCL zeigen im Gegensatz zu NHL und Leukämien häufig einen hohen Anteil von reaktiven Zellen, welche die Signalintensität der monoklonalen Population reduzieren. Eine kleiner B-Zell Klon könnte somit unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

Die Sensitivität von 60%, die in dieser Arbeit gefunden wurde, ist mit der Sensitivität der anderen Arbeiten über CBCL vergleichbar (siehe Tab. 41). Dass wir unter den oberen Werten (z.B. 79%, Child et al. 2001) einiger Untersucher liegen, kann auf verschiedene Ursachen

zurückgeführt werden: 1. In dieser Arbeit wurden in Paraffin eingebettete Proben verwendet. Paraffin-Proben zeigen gegenüber Kryoproben eine deutlich geringere Sensitivität. *Hoeve et al* (2000) konnten Sensitivitätsunterschiede bis zu 20% nachweisen. 2. Die vergleichsweise etwas geringere Sensitivität (0,5 bzw. 2,5%) der in dieser Arbeit verwendeten Elektrophoresemethode. Bei der Verwendung von radioaktiven Primern und Auswertung mit PAGE kann die Sensitivität auf 0,1% gesteigert werden (Deane und Norton 1991). 3. Auswertung der Elektrophorese-Ergebnisse: In einigen, hauptsächlich älteren Arbeiten wurde die AGE als alleiniges Mittel zur Auswertung der PCR verwandt (Trainor et al. 1991, Ramasamy et al. 1992, Essop et al. 1997, Alaibac et al. 2001). Diese Methode ist, aufgrund ihrer geringen Auflösung und der damit verbundenen Schwierigkeit zwischen poly- und monoklonalen Amplifikaten zu unterscheiden, nicht mehr empfehlenswert (Aubin et al. 1995, Child et al. 2001). Des weiteren ist mit der CE eine Amplifikatlängenbestimmung auf ein Basenpaar genau möglich (Galimberti et al. 1999). Durch diese hohe Auflösung kann man Kontaminationen und Pseudoklone erheblich besser detektieren. Außerdem wurde in dieser Arbeit jedes Ergebnis auf Reproduzierbarkeit geprüft und strenge Regeln für die Auswertung der Genescan-Profile aufgestellt. Dies kann letztlich dazu beitragen, dass der Anteil an monoklonalen Proben sinkt, da falsch klonale Ergebnisse systematisch ausgeschaltet werden können. 4. Ein Vergleich der verschiedenen Arbeiten erscheint oft schwierig, da der Anteil der einzelnen CBCL-Entitäten sehr variiert (Aubin et al. 1995). So kann bei einer CBCL-Gruppe mit einem hohen Anteil an FCCL eine niedrige Detektionsrate resultieren, da die Mutationsrate dieses Subtyps der CBCL besonders hoch ist. Auch die Auswahl der Proben, spielt eine Rolle. In einigen Arbeiten war, wie auch in dieser Arbeit, eine positive Histologie und Immunhistochemie (Aubin et al. 1995, Ritter et al. 1997, Signoretti et al. 1999, Hoeve et al. 2000) ausreichend für die Diagnosestellung eines CBCLs, bei anderen war ein klonales Rearrangement in der Southernblot Analyse ausschlaggebend (McCarthy et al. 1990, Trainor et al. 1991, Diss et al. 1993, Child et al. 2001).

Die Wahrscheinlichkeit ein klonales Rearrangement mit der PCR zu detektieren ist sicherlich höher, wenn bereits im Southernblot ein klonales Amplifikat nachgewiesen worden ist.

Die geringe Sensitivität der FR2-PCR (17%) im Verhältnis zu einem hohen Anteil an Pseudoklonen (17%) zeigt, dass diese PCR für die Routine-Diagnostik nur eingeschränkt verwendbar ist. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen *Nihal et al.* (2000), welche die FR2-PCR aufgrund von widersprüchlichen Ergebnissen nicht weiter für die Diagnostik verwandten. In früheren Arbeiten wurden mit einer FR2-PCR Sensitivitäten von bis zu 80% erreicht (Ramasamy et al. 1992, Diss et al. 1993).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Sensitivität für die FR3-PCR(sn) und FR3-PCR(s) von etwa 30% korreliert mit dem Wert von 34%, die *Child et al.* (2001) bei der Untersuchung der kutanen „low grade“ (niedrig malignen) Lymphome mit einer ungeschachtelten FR3-PCR detektierten. *Ritter et al.* (1997) und *Signoretti et al.* (1999) erreichten bei der Untersuchung der

CBCL mit einer FR3-PCR(sn) ebenfalls nur eine Sensitivität von 34% bzw. 40%.

Im Jahre 2000 verglichen *Nihal et al.* eine FR3-PCR(s) mit einer FR1-PCR(n). Ein klonales Rearrangement wurde in 11/12 Fällen mit dem FR3-Primer, aber nur in 5/12 Fällen mit dem FR1-Primerset gefunden. Dies steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen nach denen die FR1-PCR mit 47% eine höhere Sensitivität als die FR3-PCR zeigte. Die Ursache könnte sein, dass *Nihal et al.* in der zweiten Runde der FR1-PCR einen FR2-Primer verwendete, der aufgrund seiner degenerierten Sequenz schlechte Bindungseigenschaften besitzt. Die höhere Sensitivität der FR1-PCR gegenüber der FR3-PCR wurde von anderen Untersuchern bestätigt (Lehmann et al. 1995, Theriault et al. 2000, Child et al. 2001).

Child et al. (2001) konnten zeigen, dass die Verwendung von Leader-Primern die höchste Sensitivität bei der Untersuchung von CBCL hat. Mit diesen Primern konnte in der hier vorgestellten Untersuchung zwar ein Amplifikat bei der Verwendung von DNA aus PBMC produziert werden, jedoch nicht mit DNA aus Paraffinproben von Hautmaterial. Wahrscheinlich entsteht aufgrund der relativ großen Amplifikatlänge von ca. 500bp nur sehr wenig Amplifikat, so dass eine Detektion der daraus resultierenden schwachen Banden in der Elektrophorese nur mit radioaktiv markiertem Amplifikat und anschließender Autoradiographie, wie von *Child et al.* (2001) beschrieben, möglich ist.

In vielen Arbeiten wurden mehrere PCR verglichen, und die Detektionsraten variieren oft stark. Aber wenn die Ergebnisse der verschiedenen PCR kombiniert werden, steigt die Gesamtsensitivität (Diss et al. 1993, Aubin et al. 1995, Essop et al. 1997, Galimberti et al. 1999). Diese Erkenntnis stimmt mit dem Ergebnis dieser Arbeit überein.

Die in dieser Untersuchung gefundene Pseudoklonalität ist ein Phänomen, dass auch von anderen Untersuchern beobachtet wurde (Ritter et al. 1997, Nihal et al. 2000).

Die Prüfung monoklonaler Amplifikate auf Reproduzierbarkeit wie auch in dieser Arbeit erfolgt, ist somit unumgänglich.

Die Spezifität der verschiedenen PCR-Assays liegt bei den meisten Untersuchern bei 100% (Storch-Hagenlocher et al. 2000, Hughes et al. 2001, Child et al. 2001). In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine 100%ige Spezifität für die einzelnen PCR gefunden werden, mit Ausnahme der FR2-PCR. Da es sich bei den zwei klonalen Fällen um Pyodermien handelt, sind diese als falsch monoklonal zu werten. Auch in anderen Arbeiten wurden Klone in histologisch benigne erscheinenden Infiltraten gefunden (Ritter et al. 1997, Bouloc et al. 1999). Diese geringere Spezifität kann durch das Auftreten von Pseudoklonalität erklärt werden, wie vermutlich bei uns in der FR2-PCR, oder durch die Gruppeneinteilungen zustande kommen. Häufig werden sogenannte Pseudolymphome mit zu der Kontrollgruppe gezählt, bei denen monoklonale Amplifikate schon häufiger beschrieben wurden (Santucci et al. 1991, Rijlaarsdam et al. 1992, Landa et al. 1993).

4.3.3 Auswertung der Genescan-Profile

Mit Hilfe der CE ist eine Auftrennung der PCR-Produkte auf ein Basenpaar genau möglich. Das Genescan-Profil eines Amplifikats zeigt sowohl die Basenpaarlänge der Peaks als auch deren Fluoreszenzintensität, welche sich in der Peakhöhe widerspiegelt. Bei Verwendung gleicher Bedingungen für einen Genescan-Lauf (gleiche Kapillare, gleiches Polymer, etc.) liegt die Größenvariabilität der Peaks bei 0,5bp (Galimberti et al. 1999). Zusätzlich ist eine Größenvariabilität des klonalen Peaks um 1bp möglich, da die Standard Taq-Polymerase die Eigenschaft besitzt, ein Adeninnukleotid, unabhängig von der Matrize, an das entstandene Amplifikat anzuhängen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Messung der Peakhöhen eine ungefähre Schätzung des relativen Anteils klonaler Zellen erlaubt (Sprouse et al. 2000, Lukowsky et al. 2002). In den in dieser Arbeit durchgeführten Verdünnungsreihen konnte jedoch kein proportionales Verhältnis zwischen Peakhöhe und dem Anteil klonaler DNA ermittelt werden (siehe 3.3). Ursache hierfür ist sehr wahrscheinlich die geschachtelte PCR. Durch die Durchführung von zwei PCR-Ansätzen verschiebt sich das Verhältnis zwischen polyklonaler und monoklonaler DNA.

Trotz der exakten Auftrennung der Produkte erfordert die Interpretation des Profils Erfahrungen. Ursache hierfür ist, dass es auch bei benignen Dermatosen zu Abweichungen von der, idealerweise bei Polyklonalität vorhandenen, Gaußschen Verteilungskurve kommt (Witzens et al. 1997). Im Gegensatz zu der PAGE oder TGGE, wo der Untersucher nur subjektiv entscheiden kann, ob sich im relevanten Bereich eine Bande vom polyklonalen Hintergrund hervorhebt, ist mit Hilfe der Peakhöhen beim Genescan eine objektive Auswertung möglich. Die Kriterien dafür sind jedoch festzustellen (Sprouse et al. 2000). Für die Untersuchung der kutanen T-Zell Lymphome (CTCL) sind bereits einige Berechnungsmöglichkeiten veröffentlicht worden (Witzens et al. 1997, Sprouse et al. 2000, Lee et al. 2000, Lukowsky et al. 2002). Die Berechnung von *Lee et al.* (2000) beruht auf dem Verhältnis von Peakhöhe des klonalem Peak zur Peakhöhe der normal verteilten Kurve. Diese Variante setzt, wie auch die Berechnung von *Witzens et al.* (1997), ein vollständiges polyklonales Hintergrundprofil voraus. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben war dies häufig nicht der Fall. Am geeignetsten für diese Arbeit erschien deshalb die Berechnung von *Lukowsky et al* (2002) (siehe Abschnitt 3.1).

Zur Berechnung der Ratio werden nur die beiden benachbarten Peaks benötigt. Eine Überbewertung der sich am Rand befindenden klonalen Peaks wird durch die Bedingung, dass deren Peakhöhe die durchschnittliche Peakhöhe des Profils nicht unterschreiten darf, vermieden. Eine Schwierigkeit besteht in der Festlegung der Ratio, ab welcher ein Peak als monoklonal gilt. Dies ist nur durch Untersuchungsreihen mit poly- und monoklonalen Proben zu ermitteln. Bei

den CTCL scheint eine Ratio von zwei mindestens erforderlich zu sein (Sprouse et al. 2000, Lukowsky et al. 2002). *Meier et al.* (2001) legte für die Auswertung der Genescan-Profile von B-Zell NHL ebenfalls eine Ratio von mindestens zwei fest. Bei der FR1-PCR bzw. bei der FR3-PCR(sn) betrug die Ratio hervortretender Peaks im Profil der Kontrollfälle maximal 1,3 bzw. 1,4. Peak-Ratios ab 2,0 können somit als sicher monoklonal gelten. Bei der FR3-PCR(sn) konnten zwei Proben der Gruppe 1 (468/01. 18/26K) nur als unsicher monoklonal eingeschätzt werden, da der jeweilige klonale Peak nur eine Ratio von 1,9 erreichte. Da die Ratio der Kontrollen höchstens 1,4 war, wäre zu überlegen, ob bei der FR3-PCR(sn) eventuell schon Peaks mit einer Ratio von 1,9 als monoklonal eingestuft werden. Am schwierigsten war die Festlegung der Grenze bei der FR2-PCR. Bei einer Ratio von mindestens zwei traten in der Kontrollgruppe ein falsch monoklonales Ergebnis und vier Pseudoklone mit Ratios bis 3,4 auf. Aufgrund dessen sollte diese PCR nicht verwandt werden. Die FR3-PCR(s) hatte eine Ratio von höchstens 1,5 bei den Kontrollen und bei den CBCL eine Ratio von mindestens 4,3. Eine Differenzierung zwischen monoklonal und polyklonal ist somit sicher möglich.

5 Zusammenfassung

Molekularbiologische Methoden haben sich seit ca. zehn Jahren ergänzend zu Klinik und Histopathologie in der Diagnostik der kutanen B-Zell Lymphome etabliert. Besonders in frühen Stadien ist eine Abgrenzung zu benignen chronischen Entzündungen oft schwierig. Hier sind molekularbiologische Ansätze vielversprechend, da diese auf dem Nachweis von klonalen Proliferationen von B-Zellen beruhen, welche in benignen Infiltraten nicht, oder nur selten vorkommen.

Ziel der Arbeiten war die Etablierung molekularbiologischer Methoden zur Diagnostik der CBCL. Dabei sollten mehrere in der Literatur beschriebene PCR-Ansätze untersucht werden und auch verschiedene Primer neu kombiniert werden.

Ziel war es, eine Methode zu finden, bei der mit geringem Arbeitsaufwand die größtmögliche Sensitivität erreicht werden kann.

Diese Aufgaben wurden in mehreren Arbeitsschritten bearbeitet: Zunächst erfolgte die Testung der Primer mit der Simulationssoftware *Oligo*. Anschließend wurden die PCR, welche im *Oligo* ein zufriedenstellendes Ergebnis lieferten, zunächst an DNA aus polyklonalen PBMC, dann an DNA aus in Paraffin eingebetteten polyklonalen Hautproben getestet. Die PCR-Ansätze, die mit der Kapillarelektrophorese (CE) Profile mit einem Gauß-ähnlichen Verteilungsmuster lieferten, wurden für die Untersuchung der CBCL ausgewählt.

Eine monoklonale B-Zell Population zeigt eine dominante Bande im Genescan.

Durch den Vergleich von Profilen von CBCL-Proben und Proben von benignen Hautinfiltraten wurden objektive Kriterien für die Interpretation der Genescanprofile festgelegt.

Die computergestützte Analyse der Primer ergab häufig relevante Primer-Primer-Dimerisierungen.

Bei der Testung der ungeschachtelten PCR-Ansätze an polyklonaler DNA zeigte sich bis auf wenige Ausnahmen eine unvollständige bzw. gar keine Gauß-ähnliche Verteilungskurve im relevanten Basenpaarbereich.

Durch die Etablierung von halb- bzw. geschachtelten PCR-Ansätzen konnte die Ausbeute an spezifischen Amplifikat erheblich gesteigert werden.

Mit drei verschiedenen geschachtelten PCR für den IgH- FR1-; FR2- und FR3-Bereich und die bereits in der Routinediagnostik verwendete ungeschachtelte FR3-PCR wurde die Untersuchung durchgeführt.

Zum Vergleich von Klinik und Histologie mit dem molekularbiologischen Untersuchungsergebnis wurden zwei Gruppen gebildet und die aus dem Biopstat extrahierte DNA

nach ihrer Amplifikation mittels der CE (Genescan) separiert.

Bei einigen Patienten war es nicht möglich mit den vorhandenen Proben ein Amplifikat mit allen verschiedenen PCR zu erhalten.

Wenn man die Patienten, bei deren Proben kein Amplifikat produziert werden konnte, unberücksichtigt lässt, konnte in Gruppe 1 (Patienten mit klinisch und histologisch gesichertem kutanen B-Zell-Lymphom) in 60 % (21/35) ein monoklonales Amplifikat nachgewiesen werden, in Gruppe 2 (nicht an einem Lymphom erkrankte Personen) wurden bis auf die FR2-PCR, bei der zwei falsch klonale Fälle auftraten, nur polyklonale Ergebnisse gefunden.

Für die Sensitivität der einzelnen PCR-Assays ergeben sich danach folgende Prozentzahlen: FR1n – 47%, FR2n – 16%, FR3sn – 29%, FR3s – 30%, nur auf Proben bezogen, bei denen in der jeweiligen PCR ein Amplifikat produziert werden konnte. Eine höhere Sensitivität konnte für die Kombination aller vier PCR gegenüber der Routine-PCR FR3(s) statistisch gesichert werden (McNemar-Test<0,05). Die Spezifitäten differierten nicht signifikant voneinander (FR1n-100%, FR2n-91%, FR3sn-100%, FR3s-PCR-100%).

Das Auftreten von Pseudoklonen (FR1n 7%, FR2n 17%, FR3sn-PCR 3%, FR3s 0%) machte eine Prüfung auf Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unbedingt erforderlich.

Unter der Beachtung von Zeitaufwand, Sensitivität, erfolgreicher Amplifikation und Auftreten von Pseudoklonalität empfiehlt sich zuerst die Durchführung der FR3s-PCR und anschließend die Verwendung der FR1n-PCR. Nur wenn diese negativ sind oder kein Amplifikat bilden, sollte die FR3sn-PCR angewandt werden.

Für CBCL-Proben die mit allen vier PCR ein polyklonales oder gar kein Produkt bildeten, wurde noch eine zusätzliche FR3-PCR mit einem deutlich anderen FR3-Primer durchgeführt. Diese brachte keine zusätzliche Sensitivität.

Die Untersuchung einiger Proben nicht primär kutaner Lymphome zeigte eine ähnliche Sensitivität wie bei den CBCL.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass gemeinsame Verwendung der in dieser Arbeit entwickelten PCR eine Sensitivitätssteigerung von 30% auf 60% ermöglichen.

Die molekularbiologische Untersuchung ist somit als Ergänzung zum klinischen und histopathologischen Befund in der Mehrzahl der analysierten Fälle von CBCL hilfreich.

6. Literatur

- Alaibac et al. 2001, Alaibac M., Belloni-Fortina A., et al.: Immunoglobulin heavy chain variable region family expression in primary cutaneous follicle centre cell lymphomas. *Br J Dermatol* 2001;144:862-865
- Albrecht et al. 1993, Albrecht S., Bruner J., et al.: Immunoglobulin Heavy Chain Rearrangements in Primary Brain Lymphomas. A Study Using PCR To Amplify CDR3. *Journal of Pathology* 1993;169:297-302
- Arnold et al. 1983, Arnold A., Cossman J., et al.: Immunoglobulin rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N Engl J of Med* 1983;309:1593-99
- Aubin et al. 1995, Aubin J., Davi F., et al.: Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. *Leukaemia* 1995;9:471-79
- Ayling and Iland 1999, Ayling J.F., Iland H. J.: High-Resolution Analysis of Gene Rearrangements in Lymphoid Malignancies. *Pathology* 1999;31:252-256
- Bachmann 1986, Bachmann K.: *Biologie für Mediziner*, Springer-Verlag Berlin 1986;3.Auflage:253
- Bailey et al. 1996, Bailey E.M., Ferry J.A., et al.: Marginal zone lymphoma (low grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type) of skin and subcutaneous tissue. *AM J Surg Pathol* 1996;8:1011-1123
- Baldassano et al. 1999, Baldassano M.F., Bailey E.M., et al.: Cutaneous lymphoid hyperplasia and cutaneous marginal zone lymphoma; comparison of morphologic and immunphenotypic features. *AM J Surg Pathol* 1999;23(1):88-96
- Bartram 1993, Bartram C.R.: Detection of minimal residual leukaemia by the polymerase chain reaction: Potential implications for therapy. *Clinical Chim Acta* 1993;217:75-83
- Beaubier et al. 2000, Beaubier N.T., Hart A.P., et al: Comparison of Capillary Electrophoresis and Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Evaluation of T and B Cell Clonality by Polymerase Chain Reaction. *Diagn Mol Pathol* 2000;9(3):121-131
- Bergmann et al. 2001, Bergmann R., Kurtin P.J., et al.: Clinicopathologic, Immunophenotypic, and Molecular Characterization of Primary Cutaneous Follicular B-Cell Lymphoma. *Arch Dermatol* 2001;137:432-439
- Berti et al. 1990, Berti E., Gianotti R., et al: Primary cutaneous follicle center cell lymphoma: immunophenotypical and immunogenotypical aspects. *Curr Probl Dermatol* 1990;19:196-202
- Bouloc et al. 1999, Bouloc A., Delfau-Larue M.H., et al.: Polymerase Chain Reaction Analysis of Immunoglobulin Gene Rearrangement in Cutaneous Lymphoid Hyperplasias. *Arch Dermatol* 1999;135:168-172
- Breslauer et al. 1986, Breslauer K.J., Frank R., et al.: Predicting DNA duplex stability from the base sequence, *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3446-3750

- Brisco et al. 1990, Brisco M.J., Tan L.W., et al.: Development of a highly sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population. *Br J Haematol* 1990;75:163-167
- Burg et al. 1984, Burg G., Kerl G., et al.: Some Statistical Data, Diagnosis and Staging of Cutaneous B-Cell Lymphomas. *J Dermatol Surg Oncol* 1984;10:256-262
- Burg et al. 1994, Burg G., Schmidt M.H., et al.: Semimalignant („pseudolymphomas“) cutaneous B-cell lymphomas. *Dermatol Clin* 1994;12:399-407
- Burmester et al. 1998, Burmester G.R., Pezutto A. et al.: Taschenatlas der Immunologie. Thieme 1998; 20-36
- Campbell et al. 1992, Campbell M.J., Zelenetz A.D., et al.: Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire. *Mol Immunol* 1992;29:193-203
- Caro und Helwig 1969, Caro W., Helwig E.: Cutaneous lymphoid Hyperplasia. *Cancer* 1969;24:487-502
- Cerroni et al. 1994(a), Cerroni L., Volkenandt M., et al.: bcl-2 protein expression and correlation with the Interchromosomale 14;18 Translocation in cutaneous lymphomas and pseudolymphomas. *J Invest Dermatol* 1994;102:231-235
- Cerroni et al. 1994(b), Cerroni L., Kerl H.: The use of monoclonal antibodies on paraffin sections in the diagnosis of cutaneous lymphoproliferative disorders. *Dermatol Clin* 1994;12:219-229
- Cerroni et al. 1997, Cerroni L., Signoretti S. et al.: Primary Cutaneous Marginal Zone B-Cell Lymphoma: A Recently Described Entity of Low-Grade Malignant Cutaneous B-Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1997;21(11):1307-1315
- Chan et al. 1995, Chan J., Banks P.M., et al.: A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms Proposed by the International Lymphoma Study Group. *Am J Clin Pathol* 1995;103(5):543-560
- Child et al. 2001, Child F., Woolford A., et al.: Molecular Analysis of the Immunoglobulin Heavy Chain gene in the Diagnosis of Primary Cutaneous B Cell Lymphoma. *J Invest Dermatol* 2001;117:984-989
- Clark et al. 1974, Clark W.H., Mihm M.C., et al.: The lymphocytic infiltrates of the skin. *Human Pathol* 1974;5:25-43
- Clauß und Ebner 1978, Clauß G. und Ebner: Grundlagen der Statistik. Volk und Wissen Berlin 1978 ;6. Auflage:271ff.
- Cossman et al. 1991, Cossman J., Zehnbauser B., et al.: Gene Rearrangements in the Diagnosis of Lymphoma/Leukaemia. *Am J Clin Pathol* 1991;95:347-354
- Curco et al. 1997, Curco N., Servitje O., et al.: Genotypic analysis of cutaneous T-cell lymphoma : a comparative study of Southern blot analysis with polymerase chain reactin amplification of the T-cell receptor γ gene. *Br J Dermatol* 1997;137:673-679
- Deane und Norton 1991, Deane M, Norton J.D.: Immunoglobulin gene fingerprinting: an approach to analysis of B lymphoid clonality in lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 1991;77:274-281

- Delia et al. 1989, Delia D., Borello M.G., et al.: Clonal Immunoglobulin Gene Rearrangements and Normal T-Cell Receptor, bcl-2, and c-myc Genes in Primary Cutaneous B-Cell Lymphomas. *Cancer Res* 1989;49:4901-4905
- Derksen et al. 1999, Derksen P.W.B., Kerkhof E., et al.: Comparison of different polymerase chain reaction-based approaches for clonality assessment of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements in B-cell neoplasia. *Modern Pathol* 1999;12:794-805
- Desiderio et al. 1984, Desiderio S.V., Yancopoulos G.D., et al.: Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxynucleotidyl transferase in B-cells. *Nature* 1984;311:752-755
- Diaz-Cano 1996, Diaz-Cano S.: PCR-Based Alternative for Diagnosis of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangement. *Diagn Mol Pathol* 1996;5(1):3-9
- Diss et al. 1993, Diss T.C., Peng H., et al.: Detection of monoclonality in low-grade B-cell lymphomas using the Polymerase chain reaction is dependent on primer selection and lymphoma type. *J Pathol* 1993;169:291-95
- Duncan 1999, Duncan L.M.: Cutaneous Lymphoma: Understanding the New Classification Schemes. *Derm Clinics* 1999;17(3):569-592
- Elenitoba-Johnson et al. 2000, Elenitoba-Johnson K.S.J., Bohling S.D., et al.: Analysis of the Immunoglobulin Heavy Chain Gene in Polyclonal Processes Can Yield Pseudoclonal Bands as an Artefact of Low B Cell Number. *J Mol Diagn* 2000;2(2):92-96
- Essop et al. 1997, Essop M.F., Blakolmer K., et al.: Analysis of low and high grade B-cell lymphoma subtypes using semi-nested PCR and two primer sets. *Eur J Haematol* 1997;59:136-141
- Fink-Puches et al. 2002, Fink-Puches R., Zenahlik P., et al.: Primary cutaneous lymphomas: applicability of current classification schemes (European Organization for Treatment of Cancer, World Health Organization) based on clinicopathologic features observed in a large group of patients. *Blood* 2002;99:800-805
- Fodinger et al. 1999, Fodinger M., Winkler K., et al.: Combined polymerase chain reaction approach for clonality detection in lymphoid neoplasms. *Diagn Mol Pathol* 1999;8(2):80-91
- Fritsch 1998, Fritsch: "Dermatologie und Venerologie"-Lehrbuch und Atlas, Springer 1998;632-642
- Galimberti et al. 1999, Galimberti S., Brizzi F., et al.: An advantageous method to evaluate IgH rearrangement and its role in minimal residual disease detection. *Leuk Res* 1999;23:921-929
- Geelen et al. 1998, Geelen F.A., Vermeer M.H., et al.: Bcl2-protein expression in Primary Cutaneous Large B-cell Lymphoma is site related. *J of Clin Oncol* 1998;16(6):2080-2085
- Gianotti und Santucci 1993, Gianotti B., Santucci M.: Skin-Associated Lymphoid Tissue (SALT)-Related B-Cell Lymphoma (Primary Cutaneous B-Cell Lymphoma). *Arch Dermatol* 1993;129:353-355
- Golembowski et al. 1999/2000, Golembowski S., Gellrich S., et al.: Clonal Evolution in a Primary Follicle Center B Cell Lymphoma Revealed by Single Cell Analysis in Sequential Biopsies. *Immunobiology* 1999/2000;201:631-644

- Gong et al. 1999, Gong J.Z., Zheng S., et al.: Detection of Immunoglobulin κ -Light Chain Rearrangements by Polymerase Chain Reaction. *Am J Pathol* 1999;155(2):355-363
- Grönbäk et al. 2000, Grönbäk K., Möler P.H., et al.: Primary cutaneous B-Cell Lymphoma: a clinical, histological, phenotypic and genotypic study of 21 cases. *Br J Dermatol* 2000;142:913-923
- Hammer et al. 1993, Hammer E., Sanguenza O., et al.: Immunophenotypic and genotypic analysis in cutaneous lymphoid hyperplasias. *J Am Acad of Dermatol* 1993;28:426-433
- Hawkins et al. 1994, Hawkins R.E., Zhu D., et al.: Idiotypic Vaccination against Human B-Cell-Lymphoma. Rescue of Variable Region Gene Sequences from Biopsy Material for Assembly as Single-Chain Fv Personal Vaccines. *Blood* 1994;83(11):3279-3288
- Hayashi et al. 1999, Hayashi Y., Fukayama M., et al.: Polymerase chain reaction screening of immunoglobulin heavy chain and T cell receptor gamma rearrangements: A practical approach to molecular DNA analysis of non-Hodgkin's lymphoma in a surgical pathology laboratory. *Pathol Int* 1999;49:110-117
- Height et al. 1996, Height S.E., Swansbury G.J., et al.: Analysis of Clonal Rearrangements of the Ig Heavy Chain Locus in Acute Leukaemia. *Blood* 1996;87(12):5242-5250
- Hoeve et al. 2000, Hoeve M.A., Krol A.D.G., et al.: Limitations of clonality analysis of B cell proliferations using CDR3 polymerase chain reaction. *J Clin Mol Pathol* 2000;53:194-200
- Hoogeveen et al. 1998, Hoogeveen-Westerveld M., Hupkes P.E., et al: Rearranged immunoglobulin light chain genes as minimal residual disease markers in intermediate- and high-grade malignant B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leukaemia* 1998;12:1810-1816
- Hughes et al. 2001, Hughes J., Weston S., et al.: The application of a PCR technique for the detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in fresh and paraffin-embedded skin tissue. *Pathology* 2001;33:222-225
- Inghirami et al. 1993, Inghirami G., Szabolcs M.J., et al.: Detection of Immunoglobulin Gene Rearrangement of B-Cell Non Hodgkin's Lymphomas and Leukaemias in Fresh, Unfixed and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue by Polymerase Chain Reaction. *Lab Invest* 1993;68(6):746-757
- Kabat und Wu 1971, Kabat E.A., Wu T.T.: Attempts to locate Complementary Determining Residues in the variable positions of light and heavy chains. *Ann NY Acad Sci* 1971;190:382-393
- Kempf et al. 1999, Kempf W., Dummer R., et al.: Approach to Lymphoproliferative Infiltrates of the Skin. The difficult lesions. *Am J Clin Pathol* 1999;111 (Suppl.1):84-93
- Kerl et al. 1994, Kerl H., Volkenandt M., et al.: Maligne Lymphome der Haut. *Hautarzt* 1994;45:421-443
- Kerl und Cerroni 1997, Kerl H., Cerroni L.: Primary B-cell lymphomas of the skin. *Ann Oncol* 1997;8(Suppl2):29-32
- Kerl et al. 2001, Kerl H., Fink-Puches R., et al.: Diagnostic criteria of primary cutaneous B-cell lymphomas and pseudolymphomas. *Keio J Med* 2001;50(4):269-273

- Kitamura et al. 1996, Kitamura Y., Nanba E., et al.: Diagnosis of lymphoma in paraffin wax sections by nested PCR and immunohistochemistry. *J Clin Pathol* 1996;49:333-337
- Küppers et al. 1994, Küppers R., Rajewsky M., et al.: Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological section show clonal immunoglobulin rearrangements and appear to be derived from B-cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10962-10966
- Küppers et al. 1995, Küppers R., Willenbrock K., et al.: Detection of clonal λ light chain gene rearrangements in frozen and paraffin embedded tissues by Polymerase Chain Reaction. *Am J Pathol* 1995;147(3):806-814
- Landa et al. 1993, Landa N.G., Zelickson B.D., et al.: Lymphoma versus pseudolymphoma of the skin: Gene rearrangement study of 21 cases with clinicopathologic correlation. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:945-53
- Lee et al. 2000, Lee S.C., Berg K.D. et al.: Pseudo-Spikes are Common in Histologically Benign Lymphoid Tissues. *J Mol Diagn* 2000;2(3):145-152
- Lehmann et al. 1995, Lehmann C.M., Sarago C., et al.: Comparison of PCR with Southern Hybridization for the Routine Detection of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangements. *Am J Clin Pathol* 1995;103:171-176
- Liu et al. 1992, Liu Y.J., Johnson G.D., et al.: Germinal centres in T-cell dependent antibody responses. *Immunol Today* 1992;13:17-21
- Lukowsky 1990, Lukowsky A.: Aufbau und Funktion der Immunoglobulin-Vh-Gene beim Menschen. *Allerg Immunol* 1990;36:225-232
- Lukowsky et al. 2001, Lukowsky A., Richter S. et al.: A T-cell Receptor γ Polymerase Chain Reaction Assay Using Capillary Electrophoresis for the Diagnosis of Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Diagn Mol Pathol* 2002;11(2):59-66
- Marks et al. 1991, Marks J.D., Tristem M., et al.: Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes. *Eur J Immunol* 1991;21:985-991
- Matsuda et al. 1998, Matsuda F., Ishii K., et al.: The complete Nucleotide Sequence of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Locus. *J Exp Med* 1998;188(11):2151-2162
- Mc Carthy et al. 1990, Mc Carthy K.O., Sloane J.P. et al.: Rapid method for distinguishing clonal from polyclonal B-cell populations in surgical biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1990;43:429-432
- Meier et al. 2001, Meier V., Rufe A., et al.: Simultaneous Evaluation of T- and B-Cell Clonality, t(11;14) and t(14;18), in a Single Reaction by a Four Color Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay and Automated High-Resolution Fragment Analysis. *Am J Pathol* 2001;159:2031-2043
- Munksgaard et al. 2000, Munksgaard L., Frisch M., et al.: Incidence Patterns of Lyme diseases and Cutaneous B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma in the United States. *Dermatology* 2000;201:351-352
- Nagore et al. 2000, Nagore E., Ledesma E., et al.: Detection of Epstein-Barr virus and human herpes virus 7 and 8 genomes in primary cutaneous T- and B-cell lymphomas. *Br J Dermatol* 2000;143:320-323

- Neri et al. 1995, Neri A., Fracchiolla N.S., et al.: Molecular analysis of Cutaneous B- and T-Cell Lymphomas. *Blood* 1995;86(8):, 3160-72
- Nihal et al. 2000, Nihal M., Mikkola D., et al.: Detection of Clonally Restricted Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangements in Normal and Lesional Skin. *J Mol Diagn* 2000;2(1):5-10
- Quiagen 1994, Quiagen: Handbook for the Diagen TGGE-system. Quiagen Inc. 9259 Eton Avenue, Chatsworth CA 91311, USA 1994:29-32
- Ramasamy et al. 1992, Ramasamy I., Brisco M., et al.: Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *J Clin Pathol* 1992;45:770-775
- Ravetch et al. 1981, Ravetch J.V., Siebenlist U., et al.: Structure of the Human Immunoglobulin μ Locus: Characterization of Embryonic and Rearranged J and D Genes. *Cell* 1981;27:583-591
- Rijlaarsdam et al. 1990, Rijlaarsdam J.U., Meijer C.J.L.M., et al.: Differentiation between lymphadenosis benigna cutis and primary cutaneous follicular center cell lymphomas. A comparative clinicopathologic study of 57 patients. *Cancer* 1990;65:2301-2306
- Rijlaarsdam et al. 1992, Rijlaarsdam J.U., Bakels V., et al.: Demonstration of Clonal Immunoglobulin Gene Rearrangements in Cutaneous B-Cell Lymphomas and Pseudo-B-Cell Lymphomas: Differential Diagnostic and Pathogenetic Aspects. *J Invest Dermatol* 1992;99:749-754
- Rijlaarsdam et al. 1993, Rijlaarsdam J.U., Van der Putte S.C.J. et al.: Cutaneous immunocytomas: a clinicopathologic study of 26 cases. *Histopathology* 1993;23:117-125
- Ritter et al. 1994, Ritter J.H., Adesokan P.N., et al.: Paraffin section immunohistochemistry as an adjunct to morphologic analysis in the diagnosis of cutaneous lymphoid infiltrates. *J Cutan Pathol* 1994;21:481-493
- Ritter et al. 1997, Ritter J.H., Wick M.R., et al.: Assessment of Clonality in Cutaneous Lymphoid Infiltrates by Polymerase Chain Reaction Analysis of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangement. *Am J Clin Pathol* 1997;108:60-68
- Russell-Jones 1998, Russell-Jones R.: Primary cutaneous B-cell lymphoma: how useful is the new EORTC classification. *Br J of Dermat* 1998;139:945-949
- Rychlik und Rhoads 1989, Rychlik W., Rhoads R.E.: A computer program for choosing optimal oligonucleotids for filter hybridization sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 1989;17:8543-8551
- Rychlik 2000, Rychlik W.: Oligo-Primer Analysis Software. Version 6 for Windows and Macintosh, Molecular Biology Insights, Inc, February 2000
- Sander et al. 1997, Sander C.A., Kind P., et al.: The Revised European-American Classification of lymphoid Neoplasm (REAL): a new perspective for the classification of cutaneous lymphomas. *J Cutan Pathol* 1997;24: 329-41
- Sander et al. 1999, Sander C.A., Michael J. et al.: Morphologic Spectrum of Cutaneous B-Cell Lymphomas. *Dermatol Clin* 1999;17(3):593-599
- Santucci et al. 1991, Santucci M., Pimpinelli N. et al.: Primary Cutaneous B-Cell Lymphoma: A unique Type of Low-Grade Lymphoma. *Cancer* 1991;67:2311-2326

- Schmöckel et al. 1979, Schmöckel C., Burg G., et al.: Quantitative analyses of lymphoid cells in cutaneous low-grade-malignant B-Cell-Lymphomas. *Arch Dermatol Res* 1979;266:239-251
- Shelley et al. 1981, Shelley W., Wood M., et al.: Premalignant lymphoid hyperplasia: preceding and coexisting in the skin. *Arch Dermatol* 1981;117:500-503
- Shiokawa et al. 1998, Shiokawa S., Nishimura J., et al.: Establishment of a Novel B Cell Clonality Analysis Using Single-Strand Conformation Polymorphism of Immunoglobulin Light Chain Messenger Signals. *Am J Pathol* 1998;153:1393-1400
- Signoretti et al. 1999, Signoretti S., Murphy M., Puddu P., et al.: Clonality of cutaneous B-cell infiltrates determined by microdissection and immunoglobulin gene rearrangement. *Diagn Mol Pathol* 1999;8(4):176-82
- Slater 1994, Slater D.N.: MALT and SALT: the clue to cutaneous B-cell lymphoproliferative disease. *Br J Dermatol* 1994;131:557-561
- Sprouse et al. 2000, Sprouse D., Werling R., et al.: T-Cell Clonality Determination Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of the T-Cell Receptor γ -Chain gene and Capillary Electrophoresis of Fluorescently Labelled PCR Products. *Am J Clin Pathol* 2000;113:838-850
- Sterry und Staib 1995, Sterry W., Staib G.: Moderne molekularbiologische Diagnostik kutaner maligner Lymphome. *Hautarzt* 1995; 46:4-9
- Storch-Hagenlocher et al. 2000, Storch-Hagenlocher B., MD, Haas J. PhD, et al.: Molecular analysis of the CDR3 Encoding Region of the Immunoglobulin Heavy Chain Locus in cerebrospinal Fluid Cells as a Diagnostic Tool in Lymphomatous Meningitis. *Ann Neurol* 2000;47:211-217
- Sugahara et al. 1999, Sugahara K., Tsuruda K., et al.: Clonal Analysis of B-Cell Leukaemias and Lymphomas using the Polymerase Chain Reaction for the third Complementarity Determining Region of the IgH Gene: a Study of 75 Cases from Nagasaki Japan. *Leuk and Lymphoma* 1999;34:387-393
- Theriault et al. 2000, Theriault C., Galoin S., et al.: PCR Analysis of Immunoglobulin Heavy Chain (IgH) and TCR- γ Chain Gene Rearrangements in the Diagnosis of Lymphoproliferative Disorders: Result of a study of 525 cases. *Mod Pathol* 2000;13(12):1269-1279
- Tierens et al. 1996, Tierens A. Lozano M.D., et al.: High-Resolution Analysis of Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Rearrangements Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Diagn Mol Pathol* 1996;5(3):159-165
- Timischl 2000, Timischl W.: Eine Einführung für Biologen und Mediziner, Springer-Verlag 2000, 2.Auflage, S. 122f(McNemar), S.74f(Konfidenzintervall)
- Trainor et al. 1991, Trainor K.J., Brisco M.J., et al.: Gene Rearrangement in B- and T- Lymphoproliferative Disease Detected by the Polymerase Chain Reaction. *Blood* 1991;78(1):192-196
- Volkenandt et al. 1993, Volkenandt M., Burmer G.C., et al.: The Polymerase Chain Reaction. *Am J Dermatopathol* 1993;15(2):118-126
- Volkenandt et al. 1994, Volkenandt M., Wienecke R. et al.: Detection of monoclonal lymphoid cell populations by polymerase chain reaction technology. *Dermatol clin* 1994;12(2):341-349

- Weinberg et al. 1993, Weinberg J.M., Rook A.H., et al.: Molecular diagnosis of lymphocytic infiltrates of the skin. *Arch Dermatol* 1993;129:1491-1500
- Weinstock und Horn 1983, Weinstock M.A., Horn J.W.: Mycosis fungoides in the United States: Increasing incidence and descriptive epidemiology. *JAMA* 1988;260:42-46
- Willemze et al. 1983, Willemze R, de Graaf Reitsma CB, et al.: The cell population of cutaneous B-cell lymphomas. *Br J Dermatol* 1983;108:395-409
- Willemze et al. 1997, Willemze R., Kerl H., Sterry W. et al.: EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer, *Blood* 1997;90:354-71
- Witzens et al. 1997, Witzens M., Möhler T., et al.: Detection of clonally rearranged T-cell-receptor γ chain genes from T-cell malignancies and acute inflammatory rheumatic disease using PCR amplification, PAGE, and automated analysis. *Ann Haematol* 1997;74:123-130
- Wood et al. 1989, Wood G.S., Ngan B., et al.: Clonal rearrangements of Ig-genes and progression to B-cell lymphomas in cutaneous lymphoid hyperplasia. *Am J Pathol* 1989;135:13-19
- Working Formation 1982, The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's Lymphomas: summary and description of a working formation for clinical usage. *Cancer* 1982;49:2112-2135
- Yunis et al. 1982, Yunis JJ, Oken MM, et al: Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non Hodgkin's Lymphomas. *N Engl J Med* 1982;307:1231-1236
- Zhou et al. 1999, Zhou X.G., Sandvej K., et al.: Detection of clonal B-cells in microdissected reactive lymph proliferations: possible diagnostic pitfalls in PCR analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement. *J Clin Pathol* 1999;52:104-110

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Maren Marchwat

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. A. Lukowsky, der mir jederzeit mit hilfreichem Rat zur Seite stand, mir wertvolle Anregungen für meine theoretische und praktische Arbeit vermittelte und nicht müde wurde, sämtliche Passagen der Doktorarbeit immer wieder Korrektur zu lesen.

Des weiteren danke ich Herrn Dr. med. M. Muche für die ausgezeichnete Kooperation.

Allen Mitarbeitern der Labore der 5. Ebene der Hautklinik danke ich für die angenehme Zusammenarbeit.

Den Mitarbeiterinnen Frau K. Schreiber, Frau Katharina Dijkstal und Frau S. Richter danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit im Labor.